

Série A - N° 1516
N° d'ordre 2382

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Bernard GOUZON

Docteur en Pharmacie

Licencié es-Sciences

1^{re} THESE. — **Etude de quelques Porphyrines naturelles.**
Application aux pigments fluorescents de l'œuf des
oiseaux.

2^e THESE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le *20 Dec^{bre} 1934* devant la Commission d'Examen

MM. PORTIER, *Président*

ROBERT-LÉVY
LAUGIER *Examineurs*

MARSEILLE

IMPRIMERIE MARSEILLAISE

39, RUE SAINTE, 39

1934

Série A - N° 1516
N° d'ordre 2382

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Bernard GOUZON

Docteur en Pharmacie

Licencié es-Sciences

1^{re} THESE. — **Etude de quelques Porphyrines naturelles.**
Application aux pigments fluorescents de l'œuf des
oiseaux.

2^e THESE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 20 Décembre 1934, devant la Commission d'Examen

MM. PORTIER, *Président*

ROBERT-LEVY }
LAUGIER } *Examineurs*

MARSEILLE

IMPRIMERIE MARSEILLAISE

39, RUE SAINTE, 39

1934

FACULTÉ des SCIENCES de l'UNIVERSITÉ de PARIS

MM.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

<i>Professeurs honoraires</i>	{	H. LE CHATELIER.	Léon BRILLOUIN.
		H. LEBESGUE.	GOURSAT.
		A. FERNBACH.	WALLERANT.
		A. LEDUC.	GUILLET.
		Emile PICARD.	PECHARD.
		Rémy PERRIER.	FREUNDLER.

PROFESSEURS

ANET	T Electrotechnique générale.	Eugène BLOCH	T Physique théorique et physique céleste.
BERTRAND	T Chimie biologique.	G. BRUHAT	Physique.
.....	T Physique générale.	E. DARMOIS	Physique.
CAULLERY	T Zoologie (Evolution des êtres organisés).	A. DEBIERNE	Radioactivité.
.....	T Chimie générale.	A. DUFOUR	T Physique (P. C. B.)
URBAIN	T Calcul des probabilités et Physique mathém.	L. DUNOYER	Optique appliquée.
le BOREL	T Aviation.	A. GUILLIERMOND ..	T Botanique (P. C. B.)
.....	T Chimie physique.	M. JAVILLIER	Chimie biologique.
I. PERRIN	T Physique.	L. JOLEAUD	Paléontologie.
ABRAHAM	T Géométrie supérieure.	ROBERT-LÉVY	Zoologie.
CARTAN	T Physiologie végétale.	N.	Chimie physique.
MOLLIARD	T Physiologie générale.	F. PICARD	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
APICQUE	T Mécanique analytique et mécanique céleste.	Henri VILLAT	T Mécanique des fluides et applications.
VESSIOT	T Recherches Physiques.	Ch. JACOB	T Géologie.
COTTON	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	P. PASCAL	T Chimie minérale.
BRACH	T Physique.	M. FRÉCHET	T Calcul des probabilités et Physique mathém.
les FABRY	T Zoologie.	E. ESCLANGON	T Astronomie.
les PÉREZ	T Géologie structurale et appliquée.	M ^{me} RAMART-LUCAS.	Chimie organique.
n BERTRAND ..	T Chimie organique.	H. BÉGHIN	T Mécanique physique et expérimentale.
LAISE	T Théories chimiques.	FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
LESPIEAU	T Physiologie comparée.	PAUTHENIER	Physique (P. C. B.).
PORTIER	T Biologie expérimentale.	DE BROGLIE	T Théories physiques.
RABAUD	T Botanique.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
.....	T Chimie appliquée.	P. JOB	Chimie générale.
GUICHARD	Chimie minérale.	LABROUSTE	Physique du Globe.
l MONTEL	T Théorie des fonctions et théorie des transformations.	PRENANT	Zoologie.
VINTREBERT	T Anatomie et histologie comparées.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
BLARINGHEM	T Botanique.	BOHN	Zoologie (P. C. B.)
DUBOSCQ	T Biologie maritime.	COMBES	Sciences naturelles (P. C. B.).
JULIA	T Application de l'analyse à la Géométrie.	GARNIER	Calcul différentiel.
MAUGUIN	T Minéralogie.	PÉRÉS	Mécanique des fluides.
MICHEL-LÉVY ...	Pétrographie.	HACKSPILL	Chimie (P. C. B.).
BÉNARD	T Mécanique expérimentale des fluides.	LAUGIER	Physiologie générale.
DENJOY	T Calcul différentiel et calcul intégral.	TOUSSAINT	Technique Aéronautique.
LUTAUD	T Géographie physique et géologie dynamique.	M. CURIE	Physique (P. C. B.).
		G. RIBAUD	T Hautes températures.
		CHAZY	Mécanique rationnelle.
		GAULT	Chimie (P. C. B.).
		CROZE	Physique.
		DUPONT	Chimie (P. C. B.).
		LANQUINE	Géologie.

Secrétaire A. PACAUD.
Secrétaire honoraire D. TOMBECK.



A MON MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR H. BIERRY

Correspondant national de l'Académie de Médecine

Professeur de Physiologie

à la Faculté des Sciences de Marseille

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. PORTIER

Membre de l'Académie de Médecine

Professeur de Physiologie comparée

à la Faculté des Sciences de Paris

PREMIÈRE THÈSE

ÉTUDE DE QUELQUES PORPHYRINES
NATURELLES

APPLICATION AUX PIGMENTS
FLUORESCENTS DE L'ŒUF DES OISEAUX

INTRODUCTION

Les progrès réalisés au cours de ces dernières années dans les sciences biologiques sont dûs pour une large part à l'emploi de plus en plus étendu des techniques physiques et aux perfectionnements qui leur ont été apportés. Pour ne citer que quelques exemples, la mesure électrométrique du pH, l'application de l'ultra-centrifugation à la détermination des poids moléculaires, l'étude des spectres de fluorescence enfin, ont procuré au biologiste des moyens d'investigation d'une portée considérable.

Si l'on envisage plus spécialement la spectroscopie et la spectrographie de fluorescence, les résultats qu'elles ont permis d'obtenir dans la recherche et l'identification des porphyrines naturelles ou artificielles, ont montré les avantages d'une méthode qui s'avère aussi rapide que précise.

Les Porphyrines constituent toute une famille de pigments réunis par la parenté étroite de leur noyau tétrapyrrolique qui leur confère, outre une grande stabilité moléculaire, des propriétés tout à fait spéciales. La plus intéressante d'entre elles est un pouvoir fluorescent extrêmement intense puisque des solutions de porphyrine au millionième présentent encore, en lumière ultraviolette, une fluorescence très forte. La lumière rouge qu'elles émettent alors apparaît, au spectroscope, constituée par une série de bandes fines, de véritables cannelures qui permettent, grâce à la netteté de leur position, une identification parfaite de la porphyrine envisagée.

Cette propriété remarquable a amené la découverte de porphyrines dans un grand nombre d'organismes végétaux et animaux ; on a pu juger ainsi de la répartition extrêmement vaste de ces pigments, dont l'importance biologique est par ailleurs très grande, puisqu'ils constituent le noyau fondamental de la chlorophylle et de l'hémoglobine, sans lesquelles la vie ne pourrait exister à la surface du globe.

Leur activité physiologique ne s'arrête cependant pas là ; séparées de l'atome métallique, fer ou magnésium, qui leur fait jouer, dans l'organisme vivant, le rôle que l'on connaît, les porphyrines présentent la propriété extrêmement curieuse d'être des photosensibilisateurs biologiques. Jusque vers la fin du siècle dernier, on ne connaissait l'influence néfaste de la lumière solaire que dans

deux cas pathologiques : le coup de soleil dû aux radiations ultraviolettes et le coup de chaleur provoqué par l'infra-rouge. Mais, la lumière peut occasionner des accidents beaucoup plus complexes, beaucoup plus rares aussi : ce sont les phénomènes de photosensibilisation.

Les premières observations remontent à 1873 avec Vogel qui remarque l'analogie entre certains états pathologiques déclenchés par l'irradiation solaire et la sensibilisation des plaques photographiques dont l'émulsion, additionnée de colorants appropriés, devient sensible à certaines radiations lumineuses, auparavant inactives. Depuis, de nombreux auteurs, parmi lesquels il faut mentionner surtout Haussmann, Jausion et Pagès ont multiplié sur ce sujet les expériences et les constatations d'ordre médical, aboutissant ainsi à une connaissance solidement établie du syndrome de l'intoxication lumineuse. La question est cependant loin d'être résolue ; beaucoup d'inconnues obscurcissent encore un problème, déjà complexe par lui-même et qui, par ses attaches possibles avec l'étiologie des maladies infectieuses et surtout la question encore si mystérieuse du cancer, se présente désormais sous un jour particulièrement captivant.

Le présent travail, dont le but est d'éclaircir certains points particuliers de l'histoire naturelle des Porphyrines, comprend deux parties.

1° L'une, d'ordre physico-chimique, a pour but la caractérisation, par leur spectre de fluorescence, des porphyrines renfermées dans la coquille des œufs d'oiseaux, à l'état pur d'abord, puis sous forme de complexes métalliques variés.

Certaines particularités expérimentales conduisent ensuite à une étude, sur ces mêmes porphyrines, de l'action des rayons ultraviolets employés à exciter leur fluorescence. Ces radiations sont douées en effet de propriétés destructives d'autant plus remarquables qu'elles permettent une désintégration lumineuse graduée, progressive, dont on peut saisir tous les termes de passage, et cela sans le secours d'aucun ferment ou d'aucun réactif chimique violent. Cette action s'exerce non seulement sur les porphyrines, mais encore sur d'autres pigments de nature tétrapyrrolique, tels que la chlorophylle et les pigments biliaires ; à ces derniers appartient justement l'oocyan, corps très voisin de la biliverdine,

que l'on retrouve dans la coquille de nombreux œufs d'oiseaux où il constitue vraisemblablement un produit de dégradation de l'œoporphyrine. Le terme d'aboutissement de tous ces pigments se trouve être, sous l'influence de l'irradiation ultra-violette, l'urobiline, dont l'affiliation au règne animal et au règne végétal, est ainsi démontrée.

Une brève étude sur les fluorescences des parties internes de l'œuf nous permettra de retrouver dans le vitellus, grâce à son spectre de fluorescence, la protoporphyrine, dont la présence, à côté des caroténoïdes et de l'hématogène, offre le plus grand intérêt.

2° La deuxième partie, plus spécialement physiologique, comporte une étude critique des phénomènes de photosensibilisation, tels qu'ils apparaissent à la suite de nombreux travaux exposés dans les traités d'Haussmann, de Jausion et Pagès et dans plusieurs mémoires originaux. Cette étude est suivie d'expériences personnelles dont l'originalité réside surtout en ce qu'elles ont été faites avec une porphyrine naturelle : l'œoporphyrine, alors que jusqu'à présent, il n'avait été utilisé que des produits artificiels, tels que l'hématoporphyrine et l'étioporphyrine. Ces expériences démontrent qu'il y a quasi-identité entre la fluorescence et le pouvoir photosensibilisateur ; le fait que certains métaux, tels que le fer et le cuivre, annihilent à la fois ces deux propriétés dans les porphyrines et même dans la chlorophylle confirme pleinement cette manière de voir.

En définitive, l'intérêt considérable que suscite le rôle biologique des porphyrines, justifie une mise au point rapide des quelques problèmes qui seront abordés au cours de cette étude.

C'est maintenant pour moi un agréable devoir d'exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont permis d'entreprendre ce travail et de le mener à bien :

Monsieur le Professeur BERRY, à qui je dois l'idée première de ces recherches et dont j'ai mis à profit non seulement les conseils éclairés, mais toutes les ressources matérielles de son laboratoire.

Monsieur le Professeur PORTIER, qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse et m'honorer de ses encouragements.

Messieurs les Doyens MARCHAUD et RIVALS, qui m'ont toujours témoigné leur haute bienveillance.

Monsieur le Professeur BUISSON, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et me faire profiter de sa compétence reconnue de physicien. Lui et son Assistant, Monsieur C. JAUSSERAN, m'ont constamment prodigué leurs conseils et ont mis à ma disposition un excellent matériel de spectrographie.

Monsieur R. PADOVA, source inépuisable de renseignements bibliographiques dont il sait faire profiter ses anciens élèves avec autant d'à-propos que d'amabilité.

Je ne saurais oublier enfin l'excellent accueil que j'ai trouvé auprès de Monsieur le Professeur DHÉRE qui, dans son laboratoire de l'Université de Fribourg (Suisse) m'a initié, avec toute la compétence que lui confère son autorité dans le domaine des fluorescences biologiques, à un appareillage aussi perfectionné qu'on puisse le rencontrer.

PREMIÈRE PARTIE

LES PIGMENTS FLUORESCENTS DE L'ŒUF
DES OISEAUX

CHAPITRE I

Généralités sur les phénomènes de fluorescence et leur utilisation pratique

I. - Nature et Lois de la Fluorescence

La fluorescence est la propriété, pour une substance donnée, d'émettre, lorsqu'elle est excitée par un rayon lumineux primaire de longueur d'onde λ , un rayon secondaire de longueur d'onde λ' . Cette émission cesse avec l'excitation ou en tout cas ne lui survit qu'une durée de temps infiniment petite, alors que dans la phosphorescence, la production de lumière se prolonge un temps plus ou moins long après la fin de l'excitation. La limite entre les deux phénomènes ne peut être tranchée, car certaines fluorescences longues ne sont que des phosphorescences ultra-courtes.

La fluorescence peut se produire aux divers états de la matière. Certains gaz, tels le Fluor, la possèdent. Elle est fréquente chez les liquides : anthracène, huiles de pétrole. De nombreux solides, de composition chimique très variée, la présentent également : sels d'uranium, quinine, diamant, etc. Mais, pour chacun de ces corps, la fluorescence dépend essentiellement des conditions physiques qui accompagnent sa production ; ce sont en quelque sorte, des lois de la fluorescence :

1° Loi de Stokes. — La longueur d'onde des rayons excitateurs est toujours inférieure à celle des rayons émis. λ est toujours plus petit que λ' . Il peut en être cependant assez voisin. Ainsi, la fluorescence violette du salicylate de sodium est provoquée par le début de l'ultra-violet. La fluorescence rouge de la chlorophylle peut être produite aussi bien par des radiations rouges que par des radiations ultra-violettes.

2° Influence de l'état physique. — La fluorescence de certains corps, tels que les Porphyrines, ne se manifeste qu'à l'état de solutions vraies. Leurs solutions colloïdales sont dénuées de fluorescence, alors qu'à l'état solide, la présence d'électrolytes suffit pour la faire apparaître. Inversement, la bilirubine, fluorescente à l'état solide, ne l'est plus en solution.

3° Influence de la concentration. — Dans le cas des solutions fluorescentes, il n'y a pas proportionnalité, toutes autres conditions restant égales, entre le titre de la solution et l'intensité de la fluorescence. Nulle pour des concentrations très faibles, la fluorescence croît tout d'abord avec la concentration jusqu'à un optimum. Dans le cas de l'hématoporphyrine, cet optimum correspond à un taux de 1 p. 8.000. Passé ce maximum, l'intensité décroît au contraire si la concentration continue à s'élever et la fluorescence peut même disparaître complètement dans les solutions saturées.

4° Influence des rayons excitateurs. — Loi de Knoblauch. — Il y a par contre proportionnalité entre l'intensité des rayons excitateurs et celle des rayons émis : la fluorescence sera d'autant plus forte que l'appareil générateur d'ultra-violet sera plus puissant.

5° Influence de la réaction ionique. — La réaction ionique joue un rôle important dans la fluorescence des solutions. Tantôt, de légères modifications du pH peuvent amener une extinction complète de la fluorescence (sels d'uranium) tantôt, elles ne produisent que des transformations secondaires dans la lumière de fluorescence, sans affecter beaucoup son intensité : elles modifient alors le spectre de fluorescence.

II - Les Spectres de Fluorescence

Comme toute lumière, la lumière de fluorescence peut être plus ou moins complexe. Décomposée par un prisme, elle présente des zones d'intensité variable dans certaines régions, qui se traduisent par des bandes parfois très étroites, parfois suffisamment larges pour occuper tout l'emplacement d'une ou plusieurs couleurs du spectre solaire. En même temps que leur intensité relative, la position de ces bandes permet l'identification du spectre.

L'étude des spectres de fluorescence, commencée depuis peu d'années a pris, entre les mains de Dhéré et de ses élèves, un déve-

loppement considérable. Elle a facilité grandement la différenciation de nombreux pigments, en particulier les Porphyrines, très voisins par leurs autres propriétés. Il est possible maintenant, sans analyse élémentaire délicate et exigeant des quantités de substance, parfois difficiles à isoler, de suivre, par les variations de leurs spectres de fluorescence, les transformations chimiques et biologiques de ces pigments, et cela en opérant sur des quantités infinitésimales.

Deux méthodes permettent d'atteindre ce but : la spectroscopie et la spectrographie, aidée au besoin de la spectrophotométrie.

a) **Spectroscopie.** — On excite par un faisceau de rayons ultraviolets une solution de la substance à étudier, placée dans une cuve de quartz et on observe, au moyen d'un spectroscope à prisme ou à réseau la lumière de fluorescence ainsi produite. Une échelle micrométrique permet de repérer la position des bandes observées et de traduire, au moyen de la courbe de dispersion du prisme ou du réseau employé, cette position en longueur d'onde.

Cette méthode très pratique, parce qu'elle est rapide et ne nécessite qu'un matériel simple, ne peut donner toujours des résultats très précis, et cela pour deux raisons :

1° L'inégale sensibilité de l'œil aux diverses radiations. Alors que l'œil humain (dont le maximum d'acuité est, d'après Ebert, à $\lambda = 530$) percevra très bien une bande localisée dans le vert ou le jaune, il verra mal une autre bande, d'intensité réelle comparable, mais située dans le rouge, couleur à laquelle il est beaucoup moins sensible. De plus, tout le domaine nouvellement exploré de l'ultra-violet et de l'infra-rouge lui reste fermé et n'est accessible qu'à la plaque photographique.

2° Il est assez difficile, par l'observation directe, de repérer avec précision le début ou la fin d'une bande. Elle présente en effet, de son axe à ses bords extrêmes, toute une gradation d'intensité, surtout du côté des courtes longueurs d'onde, ce qui rend souvent la délimitation visuelle incommode et approximative.

b) **Spectrographie.** — Ces raisons font préférer, pour une étude minutieuse des spectres de fluorescence, l'emploi de la spectrographie, c'est-à-dire l'enregistrement sur plaque photographique du spectre obtenu par décomposition de la lumière de fluorescence. Il est ainsi possible de photographier, avec un temps de pose suffisamment prolongé, des spectres d'intensité très faible dont l'examen direct serait tout à fait impossible et l'emploi de

plaques spéciales, d'usage courant maintenant, permet d'opérer dans l'infra-rouge et l'ultra-violet aussi commodément que dans le spectre visible.

Le repérage des bandes est considérablement facilité, car il est possible de superposer à l'image du spectre étudié celle d'un spectre de raies connu, qui permettra une délimitation en longueur d'onde tout à fait précise.

Enfin, et c'est là l'avantage de toute méthode photographique, à l'observation directe souvent incertaine et variable d'un observateur à l'autre, se substitue une méthode physique sûre et qui laisse un document : le cliché photographique.

c) **Spectrophotométrie.** — Sans doute, la spectrographie, pour être complète, exigerait-elle l'aide de la photométrie, c'est-à-dire l'évaluation optique et la représentation graphique des variations de l'intensité lumineuse dans les diverses régions du spectre examiné. Fabre et Simonnet qui paraissent avoir été les premiers à appliquer cette méthode à l'étude des fluorescences, estiment que la spectrophotométrie seule peut donner des résultats certains pour l'identification d'une porphyrine par sa courbe spectrale. En théorie, cela est vrai et une telle courbe, pour l'examen de spectres très voisins par la position de leurs bandes, permet de les différencier à coup sûr. Mais en pratique, outre que la spectrophotométrie exige un matériel très délicat et très coûteux (*), elle n'est pas absolument indispensable lorsqu'il s'agit simplement de comparer entre eux des spectres assez différents par la largeur et la position de leurs bandes, ou encore d'observer l'atténuation puis la disparition d'une bande de fluorescence, fait que traduit suffisamment, à condition d'opérer dans de bonnes conditions, le cliché photographique. En un mot, dans beaucoup de cas, le « qualitatif » suffit, d'autant plus qu'avec la variété des écrans et des plaques employés, il est possible de faire varier dans de larges

(*) Il faut signaler à ce sujet que Derrien proposait, pour l'évaluation approximative de l'intensité d'une fluorescence, de l'éteindre avec des écrans de couleur complémentaire et d'épaisseur variable.

L'idée a été reprise par la Société Agfa, de Berlin, qui construit sur ce principe un petit appareil destiné à apprécier la puissance d'une lampe génératrice d'ultra-violet. On expose à son rayonnement, à une distance et pendant un temps donnés, un tube de quartz renfermant une solution rendue phosphorescente en rouge par les rayons U. V. On fait ensuite défiler devant ce tube, vu par son axé, une série d'écrans verts de plus en plus foncés. La teinte exactement complémentaire indique l'intensité de la lumière de phosphorescence et par suite la puissance du générateur d'ultra-violet.

limites les conditions de l'expérience. Les résultats obtenus à l'heure actuelle en expertise judiciaire montrent tout le parti que l'on peut tirer d'un appareillage moderne, pour l'étude des phénomènes de fluorescence (8).

III - Théories de la Fluorescence

Le pouvoir fluorescent est dû, pour de nombreux composés chimiques, à la présence dans leur molécule d'un noyau fluorophore. Plusieurs groupements organiques peuvent remplir ce rôle : pyrrol, quinoléine, isoquinoléine et conférer la fluorescence aux porphyrines, à la quinine et à la morphine qui en dérivent respectivement. Quant au mécanisme lui-même de la fluorescence, c'est une question assez controversée.

Francis Perrin (109) a établi une théorie quantique de la fluorescence. La théorie électromagnétique classique ne peut expliquer en effet qu'un corps absorbe en même temps des radiations d'une fréquence donnée et émette d'autres radiations, de fréquence différente, qu'il serait incapable d'absorber. D'après la théorie quantique au contraire, les molécules fluorescentes ne peuvent pas absorber et émettre simultanément. Dans un premier temps, sous l'influence des rayons excitateurs, certaines molécules absorbent de l'énergie lumineuse pour arriver à un « état activé » dans lequel elles possèdent un excédent important d'énergie interne. Arrivées à un degré d'activation maximum, l'équilibre est rompu et ces molécules dorénavant instables reviennent à leur état normal en émettant, sous forme de radiations lumineuses, l'énergie qu'elles avaient accumulée. Dans ce deuxième temps, se produit donc la fluorescence. Ce cycle se continue d'un groupe de molécules à l'autre aussi longtemps que dure l'excitation ; il dure fort peu de temps, car la proportion des molécules activées, par rapport aux molécules demeurées stables, est toujours faible.

Il faut noter que si parfois, la fluorescence peut durer indéfiniment sans que la substance fluorescente s'épuise ou subisse de transformation, très souvent elle s'accompagne de réactions photochimiques où l'oxygène atmosphérique joue son rôle et qui amènent une destruction plus ou moins rapide du corps fluorescent. On explique ceci par le fait que la molécule activée possède une grande réserve d'énergie et peut l'utiliser non seulement pour produire la radiation secondaire, mais encore pour effectuer des réactions avec d'autres molécules de nature variée. Et

s'il est vrai que la fluorescence s'accompagne souvent de phénomènes d'oxydation qui transforment le corps fluorescent en un autre dépourvu de fluorescence, inversement, la présence d'agents « antioxygène » (104) tels que les sulfites et certains phénols complexes, suffit pour éteindre toute fluorescence dans des substances placées cependant dans toutes les conditions voulues, et sans qu'elles paraissent avoir subi aucune transformation d'ordre chimique. On peut donc se demander si, dans certains cas, la production de fluorescence ne serait pas liée à des transformations chimiques du corps fluorescent provoquées par les radiations ultra-violettes dont l'activité chimique est, on le sait, extrêmement puissante. Nous verrons par exemple que les Porphyrines, maintenues à l'état fluorescent, se transforment rapidement pour donner place à d'autres pigments fluorescents également, mais plus résistants à l'action de l'ultra-violet. On observe avec la chlorophylle un phénomène analogue et il est vraiment remarquable que tous ces pigments ou noyaux fondamentaux de pigments biologiques : chlorophylle, porphyrines et beaucoup de caroténoïdes soient doués de fluorescence. Si l'on rapproche de ce fait l'action photosensibilisatrice des porphyrines, on peut se demander si tous ces pigments ne seraient pas des intermédiaires de l'énergie lumineuse solaire, transformant l'ultra-violet en radiations de plus grande longueur d'onde et mieux utilisables par l'être vivant.

IV - Matériel employé pour l'étude des Spectres de Fluorescence

Cet appareillage se compose de trois parties : un générateur d'ultra-violet, des filtres et un spectrographe comprenant lui-même un collimateur, un système de prismes et une chambre photographique.

1° **Appareil générateur d'ultra-violet.** — Deux sources peuvent être utilisées : l'arc au fer et l'arc au mercure. La première consiste à faire jaillir un arc sous faible voltage (40 volts) et forte intensité entre deux charbons à âme de fer (charbons de Eder). On pourrait employer des baguettes de fer pur, mais ces charbons sont préférables parce qu'ils s'usent moins tout en fournissant une lumière très riche en radiations ultra-violettes et présentant les nombreuses raies du fer dans toute l'étendue du spectre. C'est là un excellent générateur d'ultra-violet pour l'étude des fluorescences à condition d'être alimenté par du courant continu. Si l'on emploie du courant

alternatif, l'arc se déplace constamment, ce qui oblige à modifier sans cesse la position de la cuve renfermant la solution fluorescente pour que son éclaircissement demeure régulier. Il est préférable dans ce cas de recourir à l'arc au mercure.

Cet arc se produit dans une ampoule recourbée en quartz où l'on a fait un vide poussé et renfermant à ses deux extrémités une petite quantité de mercure en contact avec les électrodes. Il existe dans le commerce un certain nombre d'appareils basés sur ce principe et destinés surtout aux usages médicaux : ils possèdent en général une troisième électrode qui permet de les faire fonctionner aussi bien sur du courant alternatif que sur du continu, sans grandes différences dans le rendement. Le circuit étant fermé, il suffit pour amorcer l'arc de faire basculer l'ampoule et d'amener en contact les deux nappes de mercure. Au moment de la rupture, l'arc s'établit et s'entretient régulièrement en donnant une lumière intense qui renferme, à côté des raies visibles du mercure, plusieurs raies situées dans l'ultra-violet et en particulier la raie $365\text{ m}\mu$, très puissante.

Quoique moins riche que l'arc au fer en radiations ultra-violettes, l'arc au mercure lui est préférable par sa plus grande régularité et son maniement plus commode.

2° Ecrans. — Le but des écrans est d'éliminer toute la lumière visible produite par l'arc sans opposer d'obstacle trop grand au passage des radiations ultra-violettes. On a employé tout d'abord des cuves renfermant des solutions appropriées, imperméables aux rayons visibles, mais depuis la découverte des verres de Wood à l'oxyde de nickel, il est beaucoup plus pratique d'utiliser des écrans de verre dont les maisons Schott et Pyrex fabriquent toute une gamme parmi laquelle on peut, suivant la longueur d'onde désirée, choisir l'écran convenable. Le verre dit de Wood ne laisse passer que les radiations inférieures à $\lambda = 365\text{ m}\mu$, entièrement comprises par conséquent dans l'ultra-violet. Mais lorsque les rayons excitateurs appartiennent à la limite du violet et de l'ultra-violet (c'est le cas des porphyrines), il est préférable d'employer des écrans laissant passer, outre l'ultra-violet, un peu de l'extrême-violet jusqu'à la raie $404,7\text{ m}\mu$ du mercure. La fluorescence se produit alors avec un bien meilleur rendement.

Dans tous les cas, il faut vérifier soigneusement, si l'on désire étudier des fluorescences rouges, que les écrans employés ne livrent passage à aucune radiation de cette couleur. Comme l'a fait remarquer Ch. Dhéré, l'arc au mercure, quoique très pauvre en radia-

tions rouges en possède suffisamment pour fausser, si elles ne sont pas arrêtées, les spectres de fluorescence à enregistrer.

3° **Cuves.** — La solution dont on veut provoquer la fluorescence doit être placée dans une cuve à faces parallèles en quartz ou à la rigueur en verre mince. L'absorption des rayons ultra-violets par le verre est en ce cas suffisamment faible pour n'entraîner qu'une déperdition insignifiante de lumière excitatrice. La cuve est placée sur un support perpendiculairement au faisceau ultra-violet, concentré au moyen d'un condensateur en quartz. Ce condensateur est disposé de telle sorte qu'il projette sur la cuve une image nette de l'arc : la mise au point est alors correcte et le rendement maximum.

4° **Collimateur.** — Le collimateur est constitué par un tube métallique de 45 cm. de longueur, portant à une extrémité un objectif achromatique de foyer = $440^{\text{m/m}}$ (ouverture = $f\ 1/10$ environ) et à l'autre une fente de largeur réglable. Cette fente vient s'appliquer contre la cuve renfermant la solution fluorescente, et le collimateur est disposé de telle sorte que son axe fasse un angle de 90° avec les rayons excitateurs ultra-violet. La fente du collimateur peut ainsi capter la lumière de fluorescence, sans laisser entrer cependant de radiations U. V., dangereuses pour la plaque photographique. Il est avantageux également de placer cette fente le plus près possible de la face de la cuve exposée aux rayons excitateurs, surtout lorsque la solution fluorescente absorbe fortement l'ultra-violet. Ces précautions observées, on peut, malgré l'intensité toujours assez faible de la lumière de fluorescence, opérer avec une fente assez étroite : 0 mm 1, en employant des plaques rapides et prolongeant le temps de pose.

5° **Prismes.** — Il est difficile d'obtenir, avec un seul prisme, un pouvoir dispersif suffisant dans les régions les moins réfrangibles du spectre : orangé et rouge. Aussi ai-je dû employer, pour l'étude spectrale des porphyrines, un système de deux prismes identiques, en flint lourd, répondant aux caractéristiques suivantes :

Hauteur de l'arête = $55^{\text{m/m}}$.

Largeur de l'arête = $48^{\text{m/m}}$.

Angle de l'arête = 63° .

Indice de réfraction = 1,17.

Le côté opposé à l'arête utile est noirci au vernis mat : les deux prismes possèdent ainsi la réflexion totale.

6° Chambre photographique. -- La chambre photographique comprend à l'arrière un châssis à glissière permettant d'obtenir plusieurs clichés de spectres sur la même plaque 9/12. L'objectif est un anastigmat de 240^{mm} de foyer, largement ouvert à $1/4,5$ et possédant une bonne correction chromatique.

Il est de toute nécessité d'employer des plaques panchromatiques. La marque « Ilford Special Rapid Panchromatic » m'a donné les meilleurs résultats. Ces plaques possèdent en effet une bonne sensibilité, assez régulière dans toute l'étendue du spectre, quoique un peu moindre dans le vert. Leur rapidité dans le rouge les rend particulièrement commodes pour l'étude de la fluorescence des porphyrines et des chlorophylles. On peut employer dans ce dernier cas les plaques Agfa 730 ou Ilford Infra-Red qui, sensibles à l'extrême-rouge et au début de l'infra-rouge, permettent d'enregistrer des bandes de fluorescence indécélables avec d'autres plaques.

7° Spectre de comparaison. — Pour repérer commodément les bandes de fluorescence sur le cliché obtenu et délimiter leur position, on leur superpose ordinairement un spectre de raies qui serviront de repères. Un petit volet placé devant la fente du collimateur et coulissant latéralement, permet de démasquer à volonté la partie supérieure ou inférieure de la fente ; on peut ainsi enregistrer côte à côte le spectre à étudier et le spectre de comparaison sans avoir à déplacer le châssis porte-plaque.

Une solution pratique, lorsque l'arc au mercure sert à exciter la fluorescence, consiste évidemment à utiliser pour le repérage le spectre de ce métal. Mais, l'absence complète de raies dans le rouge et le petit nombre des autres — 5 seulement — ne permettent pas une délimitation assez précise. Ch. Dhéré et ses élèves emploient le spectre de l'Hélium, qui possède plusieurs raies très belles dans le rouge et l'orangé. Mais, ne disposant pas, pour mon compte, de tube de Plucker à hélium, une solution avantageuse m'a été fournie par les lampes à effluves, dites lampes-veilleuses, que l'on trouve maintenant dans le commerce (Philips, Osram). Ces lampes, fonctionnant sur le secteur à 110 v., donnent une lueur rouge assez faible, mais que l'on peut concentrer sur la fente du collimateur au moyen d'une lentille convergente. On obtient ainsi, outre les raies peu intenses de l'hélium et de l'argon rouge, celles du néon, très fortes et particulièrement abondantes dans toute la région qui s'étend du jaune à l'extrême-rouge. Entre $5.850 \text{ \AA}$ et $7.000 \text{ \AA}$, il s'en rencontre une quinzaine grâce auxquelles il est

possible de repérer avec une grande précision les bandes de fluorescence des porphyrines et de leurs complexes métalliques, enregistrées au-dessous.

V. - Spectroscopie de Fluorescence

Dans un but de contrôle, les résultats obtenus par spectrographie ont été vérifiés au moyen d'un spectroscopie à fluorescence. J'ai employé à cet usage le « Reversion Spectroscope » à réseau d'Hartridge. Cet appareil, d'emploi très commode, donne deux images du spectre examiné : l'une normale, l'autre superposée à la première et renversée. Il suffit, pour connaître l'axe d'une bande d'absorption ou de fluorescence d'amener en coïncidence parfaite les deux bandes correspondantes supérieure et inférieure : la déviation, lue au moyen d'une vis micrométrique graduée, permet de se reporter à une courbe étalonnée donnant la position de l'axe cherché. Cet appareil donne, avec un peu d'habitude, une approximation de $5 \text{ \AA}$; son seul inconvénient est celui de tous les spectroscopes à réseau : une luminosité assez faible. On y supplée, dans le cas d'une lumière de fluorescence déjà peu intense par elle-même, en employant une source d'ultra-violet puissante et une fente relativement large.

VI. - Résultats obtenus

Avec l'appareillage ainsi décrit, les temps de pose (sur plaques Ilford special rapid panchromatic) ont été les suivants :

a) Pour les spectres de fluorescence des porphyrines, en opérant avec des solutions à 1 p. 50.000 (optimum de concentration) et une largeur de fente égale à 0 mm 1 :

3 minutes, 6 minutes et 10 minutes, suivant l'écran employé.

b) Pour le spectre de comparaison (néon), avec une largeur de fente égale à 0 mm 05 :

30 secondes et 1 minute, suivant qu'il convenait d'obtenir toutes les raies secondaires ou seulement les raies principales.

c) Pour les spectres d'absorption, avec une lampe à incandescence « lumière du jour » 50 bougies et une largeur de fente égale à 0 mm 1 : 5 secondes.

Le repérage des axes a été fait au microscope sur les clichés primitifs, à l'aide d'une échelle de longueurs d'onde précise. Ces clichés ont été ensuite agrandis au rapport 2,3 sur du papier à gradation normale, pour donner les planches qui illustrent ce travail.

Deux méthodes peuvent être employées pour présenter un spectre d'absorption ou de fluorescence :

1° Enregistrer sur la même plaque, les uns au-dessus des autres, plusieurs clichés du même spectre, pris avec des temps de pose croissants.

2° Enregistrer côte à côte un seul cliché de chaque spectre différent, pris avec le même temps de pose convenablement choisi.

De ces deux méthodes, j'ai préféré la seconde qui permet de mieux mettre en relief les caractéristiques d'un spectre donné et les différences qui le séparent d'un autre, placé tout à côté de lui.

N.-B. — Pour la plupart des spectres étudiés, j'ai repéré les bandes de fluorescence par leurs axes plutôt que par leurs bords extrêmes. Alors que, sur le cliché photographique, l'axe d'une bande demeure sensiblement constant, ses bords extrêmes s'allongent à mesure qu'augmente le temps de pose. De plus, si ces bords se terminent nettement du côté des grandes longueurs d'onde, ils sont ordinairement moins bien délimités et forment dégradé du côté des courtes longueurs d'onde, ce qui rend difficile leur repérage exact. Définir une bande par son axe paraît donc à la fois plus constant et plus précis.

Bien que le présent travail soit intentionnellement limité à l'étude des spectres de fluorescence, j'ai cru bon de faire figurer (Planche IV) les spectres d'absorption des pigments les plus importants. Ceci à un point de vue seulement documentaire et sans insister sur les caractéristiques de ces spectres, déjà données avec précision par un grand nombre d'auteurs.

Les Pigments de l'Œuf des Oiseaux

Les Porphyrines

I. - Constitution de l'œuf

L'œuf comprend 3 parties : la coquille, le blanc ou albumen et le jaune ou vitellus (123).

Le jaune, essentiellement constitué par des matières grasses et des phosphatides, doit son nom à un pigment lipo-soluble, plus ou moins abondant, et auquel Willstätter et Escher ont donné le nom de lutéine. Nous verrons plus loin en quoi consiste cette lutéine, actuellement bien connue.

Le blanc est formé d'une solution colloïdale d'albumines et de globulines. Il n'est pas ordinairement très coloré, mais possède néanmoins une fluorescence plus ou moins intense en lumière de Wood.

La coquille enfin, couche calcaire recouvrant et enfermant complètement l'œuf proprement dit, mérite, à cause des pigments importants qu'elle renferme, une étude plus approfondie. Réduite chez les serpents à une membrane cornée, dépourvue de calcaire, elle présente chez les oiseaux et les chéloniens des caractères semblables et revêt parfois, chez l'autruche et la tortue marine, une épaisseur considérable. La coquille est séparée du blanc par une membrane translucide : la membrane coquillière, et son épaisseur est parcourue par des canalicules anastomosés entre eux et s'ouvrant à la surface ; d'après Rizzo, on en compterait 7 à 8.000 dans un œuf de poule. A sa surface, la coquille est recouverte d'une mince cuticule qui pénètre dans les canalicules et en ferme l'ouverture aux liquides, mais non au gaz. Toutefois, les solutions de bleu de méthylène et de chlorure de sodium peuvent diffuser, à travers la coquille, vers l'intérieur de l'œuf, alors que la garance et l'encre sont arrêtées.

La coquille renferme du calcium, du magnésium, des traces de

fer et de silicium, du phosphore, du soufre et de l'anhydride carbonique. Le magnésium et le phosphore peuvent manquer. Chez l'autruche, la composition moyenne est la suivante (Balland) :

Co ³ Ca	91,44
Mg O	2,03
Phosphate tricalcique	0,70
Matière sulfurée	4,92
Eau	0,73
Pertes	0,18

la densité moyenne de la coquille est de 0,9514.

Chez l'oiseau, toutes les enveloppes sont formées en moins de 48 heures ; la coquille s'élabore dans l'oviducte dont la paroi est garnie d'un grand nombre de glandes. Ces glandes secrètent un liquide trouble et filant contenant en suspension des corpuscules plus ou moins petits de calcaire. La précipitation en est rapide : en 5 heures, un œuf de bois est déjà recouvert de calcaire et, chez la poule, l'œuf devient entièrement dur en 15 heures.

II. - Les pigments des œufs d'oiseaux

Presque tous les œufs présentent une coloration plus ou moins marquée : les œufs entièrement blancs sont assez rares. Mais tantôt leur teinte est uniforme, tantôt la coquille est plus ou moins irrégulièrement tachetée. La couleur va, chez la poule, du blanc pur au brun foncé, en passant par toutes les nuances intermédiaires. Chez le canard, la coquille est verdâtre et parfois rose. Certains oiseaux sauvages comme le geai et l'étourneau pondent des œufs franchement bleus. Chez d'autres oiseaux, la surface de l'œuf est tachetée de brun et de vert (pie) ou parsemée de grosses taches irrégulières allant du vert olive au noir d'encre (mouette). En présence de ces colorations si variées, il semble donc bien que plusieurs catégories de pigments doivent intervenir.

La première étude qui ait été faite de ces colorations remonte à Sorby (130) qui, en 1875, isola des œufs de divers oiseaux un pigment, nommé par lui « oorhodéine » ; il en détermina la bande d'absorption $\lambda = 630$, en solution dans l'alcool neutre.

Krukenberg (86), en 1883, remarqua le premier la fluorescence rouge donnée par des liquides ayant dissous des coquilles d'œufs. A peu près au même moment, Mac Munn signale le spectre d'absorption du pigment retiré des œufs de poules cochinchinoises,

mais ne songe pas à l'identifier aux porphyrines, qu'il découvrait par ailleurs dans un certain nombre d'organismes animaux.

C'est en 1910 que Lehmann (91) signale pour la première fois la fluorescence de la coquille d'œuf de poule en lumière ultra-violette. Plus tard (1923) H. Fischer et Fr. Kögl (58) extraient les pigments des œufs d'un grand nombre d'oiseaux : vanneau, mouette, faisan, etc., etc., mais ramènent tout à une porphyrine qu'ils nomment : coporphyrine. Ils donnent les valeurs des bandes d'absorption pour chaque œuf examiné. après dissolution de la coquille dans un mélange d'alcool méthylique et d'acide chlorhydrique, mais ne parlent pas de la fluorescence.

Derrien (28) étudiant systématiquement les fluorescences biologiques (1924) remet en question celle des coquilles d'œuf de poule, mais sans en déterminer les constantes physiques. Königsdörfer (85) le fait en 1928 et indique un spectre de fluorescence formé de deux bandes dans le rouge :

Une très forte de 638 à 624 $m\mu$ (axe $\lambda = 631$),

Une plus faible de 677 à 660 $m\mu$ (axe $\lambda = 668,5$).

Lemberg (92) enfin, en 1931, s'est attaché aux pigments d'origine biliaire, qui accompagnent la porphyrine dans la coquille de certains œufs. Il a extrait de l'œuf de mouette une substance verte, voisine de la biliverdine, qu'il a obtenue cristallisée. Ce pigment nommé par lui « Oocyan » possède des propriétés tout à fait remarquables, mais différentes toutefois de celles de la biliverdine ce qui a conduit Lemberg à lui attribuer une constitution chimique particulière.

Nous avons repris cette étude, H. Bierry et moi (13) en 1932, pour tenter d'élucider certaines divergences qui séparaient les auteurs, sur les pigments de l'œuf de poule. Il semblait admis que l'ooporphyrine de Fischer était identique à la protoporphyrine, celle qui, unie au fer, constitue l'hémochromogène, substance mère de l'hémoglobine. D'autres cependant affirmaient que par dissolution de la coquille d'œuf de poule, on obtenait le spectre de l'hématoporphyrine. Est-ce bien d'autre part la même porphyrine que l'on trouve de façon constante dans la coquille de tous les œufs ? Quelle est sa signification physiologique ? Autant de questions qui m'ont paru intéressantes à approfondir pour tenter d'expliquer la présence, dans la coquille de l'œuf, d'une substance dont les propriétés physiques, chimiques et biologiques sont tout à fait spéciales. Mais auparavant, il faut, pour bien situer la question, donner un aperçu de ce que sont les porphyrines, de leurs parentés, de leurs différences et de leur répartition dans la nature.

III - Constitution chimique et Propriétés des Porphyrines

Les porphyrines constituent toute une famille de pigments animaux et végétaux présentant la même similitude de constitution chimique et des propriétés très voisines. Elles sont formées d'un noyau tétrapyrrolique, le noyau « Porphine » de Fischer, autour duquel viennent se greffer des chaînes latérales variées : méthyle, éthyle, alcool primaire, alcool secondaire qui amènent dans cette lourde molécule des modifications de détail, à côté de caractères généraux remarquablement constants.

Le nom de Hans Fischer est attaché à l'analyse puis à la synthèse de ce groupe de corps pour lesquels ses élèves et lui ont mis en œuvre toutes les ressources de la chimie organique. Ces travaux ont été exposés dans une conférence d'A. Kirmann (83), à laquelle sont empruntées les données, développées ici, sur les porphyrines les plus remarquables.

On divise ordinairement les porphyrines en deux classes : les porphyrines naturelles et les porphyrines artificielles, les secondes dérivant, ou bien des premières par transformation chimique, ou bien d'autres corps par désintégration. Sans doute n'est-ce là qu'une classification assez conventionnelle car, outre que des porphyrines réputées artificielles, telle l'hématoporphyrine, se rencontrent certainement dans des produits naturels, toutes les porphyrines dites naturelles ont été reproduites synthétiquement, durant ces dernières années, par H. Fischer.

a) *Propriétés Physiques*

Ce sont tous des corps bruns, cristallisant en aiguilles ou en tablettes douées de la double réfringence. Insolubles dans l'eau, elles sont solubles dans les solvants organiques, ainsi que dans les liqueurs acides ou alcalines. Cependant, elles ne présentent pas toutes la même solubilité dans le chloroforme et c'est là un caractère qui a été employé pour les distinguer. Les unes sont chloroforme-solubles, telles la protoporphyrine et l'uroporphyrine ; d'autres, et les porphyrines artificielles rentrent dans cette catégorie, y sont presque totalement insolubles : hématoporphyrine, mésoporphyrine. Leurs solutions possèdent une coloration variable allant du rouge sang et du grenat au brun foncé, suivant le solvant, mais surtout une fluorescence rouge vif, visible déjà en lumière du jour et beaucoup plus intense en lumière de Wood.

Ce sont des corps résistant bien à la chaleur ; certains peuvent fondre dans le vide et même sublimer sans altération ; le noyau tétrapyrrolique est très stable et ne se scinde qu'à une température élevée pour donner de l'hémopyrrol.

b) *Propriétés chimiques*

Les porphyrines sont des corps facilement oxydables surtout à l'état dissous : elles donnent en ce cas des chromogènes incolores. Sous l'action de la lumière, la modification est encore plus rapide et conduit à des corps entièrement nouveaux. Schumm (128), avait remarqué depuis longtemps cette fragilité à la lumière, surtout en présence de solutions de potasse ; le pigment est alors altéré et passe très vite au vert. C'est là la « Kalilichtreaktion », longuement étudiée par Günther (74). Les porphyrines sont amphotères ; elles peuvent, à l'exception de l'étioporphyrine, se comporter comme des acides et donner des éthers-sels définis ; elles peuvent également fonctionner comme bases et fournir avec les acides, HCl en particulier, des sels bien cristallisés. Willstätter (148) s'était basé sur cette propriété pour différencier les porphyrines par leur indice d'HCl (Salzsaurezahl). Cet indice d'HCl est la concentration centésimale en HCl d'une liqueur qui, agitée avec un égal volume d'une solution de porphyrine dans l'éther, lui enlève les deux tiers du pigment. Pour l'hématoporphyrine, cet indice est compris entre 0,1 et 0,15 % d'HCl ; l'acide à 0,033 % n'enlève que des traces de pigment, l'acide à 0,4 % l'enlève en presque totalité. En réalité, le seul caractère qui permette, à part l'analyse élémentaire, une caractérisation certaine des porphyrines, est la délimitation de leur spectre d'absorption ou mieux de leur spectre de fluorescence. Ce spectre présente des bandes dont les positions, variables d'une porphyrine à l'autre, ont été très exactement repérées par Ch. Dhéré (44), pour les 6 porphyrines les plus connues, dissoutes en milieu acide et en milieu neutre.

La propriété chimique la plus importante des porphyrines est de donner des produits d'addition, sortes de complexes très stables, avec un certain nombre de métaux, la fixation du métal se faisant sur les atomes d'azote de deux noyaux pyrroliques voisins. Toutefois, en ce qui concerne la fluorescence, la nature du métal fixé dans la molécule n'est pas indifférente ; si elle amène parfois des modifications qualitatives (Zn, Pb, Sn) de la fluorescence, elle peut en produire l'extinction complète (Fe, Cu, Co, Ni). Nous reviendrons plus loin sur cet important caractère.

c) *Facilité d'adsorption des Porphyrines*

Les porphyrines possèdent la propriété remarquable, et qui n'avait pas encore été signalée à ma connaissance, de se laisser adsorber très aisément par les carbonates alcalino-terreux. Il se forme ainsi une sorte de complexe très solide, dont il est presque impossible de faire sortir la porphyrine, sans détruire le carbonate qui lui sert de support. Le phénomène se produit de la manière suivante :

Si, dans une solution, en milieu faiblement acide, de proto-porphyrine ou d'hématoporphyrine, on provoque la formation d'un précipité très fin de carbonate de calcium, toute la porphyrine est adsorbée et il n'en reste que des traces infimes en solution. On prépare dans ce but une solution à 1 p. 20.000 d'hématoporphyrine dans HCl n/10. On en prend 200 cc. auxquels on ajoute 20 cc. d'une solution de chlorure de calcium à 25 %, puis, par petites portions et en agitant, 50 cc. d'une solution à 10 % de carbonate de sodium anhydre. Il se forme un abondant précipité de carbonate de calcium qui, recueilli et séché, présente une teinte brune accentuée et une fluorescence rouge intense en lumière de Wood, alors que la liqueur-mère, complètement incolore, ne montre plus qu'une très faible fluorescence. Toute l'hématoporphyrine a donc été pratiquement entraînée par le précipité. Le résultat est le même, si l'on remplace le chlorure de calcium par du chlorure de strontium ou de baryum : le carbonate correspondant manifesterait, vis à vis de la porphyrine, le même pouvoir adsorbant.

Peut-être ce phénomène, facile à observer « in vitro », permet-il d'expliquer celui qui se produit « in vivo », dans l'utérus de l'oiseau, au moment où le calcaire se dépose sur la membrane coquillière. Par un mécanisme analogue, la porphyrine mise en liberté à ce moment-là serait adsorbée par le carbonate de chaux et aussitôt incorporée à la coquille. D'ailleurs, ce complexe porphyrine- Co^3Ca , qu'il se soit formé « in vitro » ou « in vivo », est très stable ; pour récupérer la porphyrine ainsi fixée, il est indispensable d'ajouter au solvant organique employé un acide fort qui attaque le calcaire et le dissout. Comme l'a signalé Dhéré (43) « la porphyrine contenue dans la coquille ne se dissout pas directement dans l'éther et la pyridine », pas plus que dans aucun autre solvant « neutre » des porphyrines. Il faut remarquer aussi que les porphyrines, dénuées de fluorescence à l'état solide, acquièrent cette propriété lorsqu'elles sont ainsi fixées sur du calcaire,

sans doute parce qu'elles se trouvent alors à l'état de division extrême ; ce qui explique que la coquille de l'œuf soit directement fluorescente aux rayons ultra-violet.

IV - Les Porphyrines artificielles

La plus anciennement connue est : **l'Hématoporphyrine** $C^{34} H^{38} N^4 O^6$. Elle se produit dans l'action d'un acide fort et concentré sur l'hémine ou sur le sang lui-même. Sa fluorescence a été découverte en 1880 par Hoppe-Seyler et deux procédés de préparation ont été indiqués par Nencki (105), puis par Willstätter (148), basés sur l'action de l'acide acétique saturé de gaz bromhydrique sur l'hémine. Elle possède dans sa molécule 2 oxhydriles et 2 doubles liaisons.

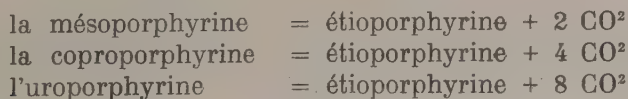
La **Mésoporphyrine** $C^{34} H^{38} N^4 O^4$ résulte de la réduction de l'hémine par l'acide iodhydrique en présence d'iodure de potassium qui enlève le fer (méthode Nencki et Zaleski) ; elle présente la particularité de s'unir très facilement au cuivre, pour donner un complexe. Sa fluorescence a été signalée par H. Fischer.

L'Étioporphyrine $C^{32} H^{38} N^4$ a été préparée en 1912 par Willstätter en partant de la chlorophylle et de l'hémoglobine : c'est le premier connu des pigments communs au règne végétal et au règne animal. Elle se forme lorsqu'on chauffe dans un tube de l'uroporphyrine pulvérisée : il se dégage CO^2 et des vapeurs violettes d'étioporphyrine se condensent dans les parties froides du tube. Deux autres procédés ont été donnés pour l'obtention de cette porphyrine, la seule de la série qui ne renferme pas d'oxygène :

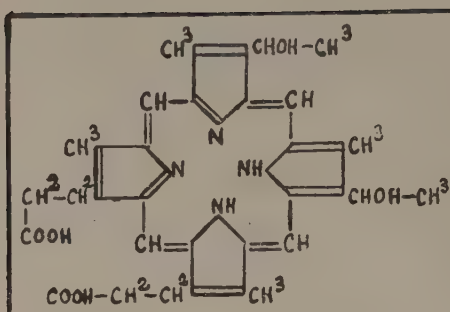
1° Décarboxylation de la mésoporphyrine et de l'hématoporphyrine ;

2° Action de l'acide sulfurique concentré sur le méthène bromé du cryptopyrrol (Fischer et Clarer) (65).

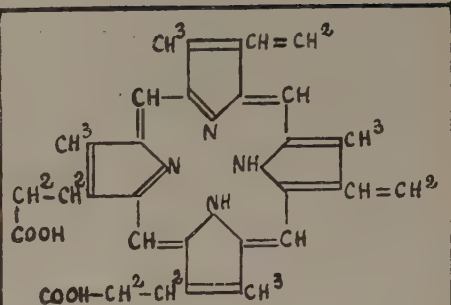
L'étioporphyrine est chimiquement le noyau de 3 autres porphyrines auxquelles elle aboutit par fixation d'un nombre croissant de molécules d'anhydride carbonique. Ainsi :



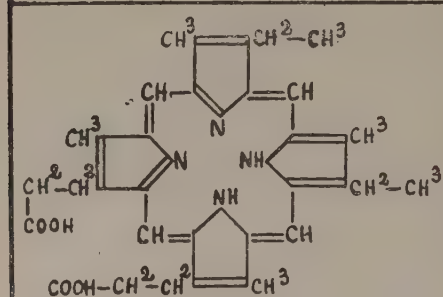
Outre ces porphyrines déjà anciennement connues, un grand



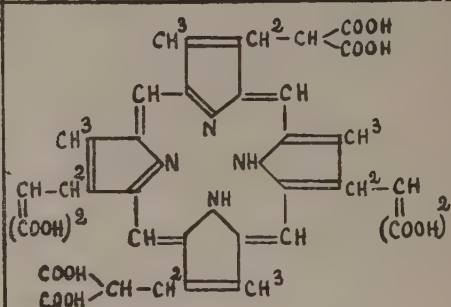
Hématoporphyrine



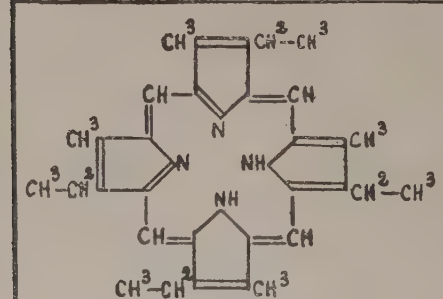
Protoporphyrine



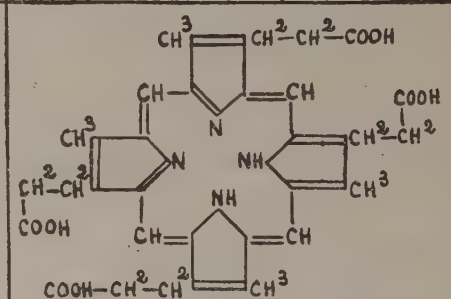
Mésoporphyrine



Uroporphyrine



Etioporphyrine



Coproporphyrine

nombre d'autres ont été obtenues, au cours de ces dernières années, par Fischer. Elles proviennent, soit de l'hémoglobine, soit de la chlorophylle, par désintégration plus ou moins poussée.

Parmi les premières, se rangent :

l' Hémoporphyrine	$C^{33} H^{38} N^4 O^4$
l' Hémidoporphyrine	$C^{33} H^{38} N^4 O^6$
et l' Héminoporphyrine	$(C^{33} H^{37} N^4 O^{5,5})^2$

De la chlorophylle dérivent enfin, par chauffage à l'autoclave en présence d'alcalis, des phyllines, dans lesquelles les acides détachent le magnésium en donnant naissance à plusieurs porphyrines : Glaukoporphyrine, Rhodoporphyrine, Phylloporphyrine, Verdoporphyrine, Phéoporphyrine, ramenant peu à peu au terme le plus simple : l'Étioporphyrine, déjà obtenue en partant de l'hémoglobine.

V. - Les Porphyrines naturelles

Connues depuis les travaux de Mac Munn (1883) (95) qui les avait signalées dans un grand nombre d'organismes animaux, ces porphyrines ont été retrouvées depuis par Fisher et ses élèves, par Derrien, par Dhéré dans toute une série de représentants nouveaux du règne animal et même du règne végétal, ce qui montre leur large répartition. Rangées au début sous le nom générique d'hématoporphyrine, à laquelle elles ne paraissent que rarement s'identifier, elles ont été, à mesure que les recherches se poursuivaient, nettement séparées et ramenées à 3 principales :

la Protoporphyrine	$C^{34} H^{34} N^4 O^4$
l' Uroporphyrine	$C^{40} H^{38} N^4 O^{16}$
et la Coproporphyrine	$C^{36} H^{38} N^4 O^8$

Dans les excréments se trouve en quantité variable une porphyrine que l'on a nommée la coproporphyrine. Elle se rencontre parfois aussi dans l'urine des animaux.

A l'état pathologique, lorsque le foie, après une intoxication par le véronal ou le sulfonal, fonctionne mal, il apparaît, en grande quantité dans l'urine, une autre porphyrine : l'uroporphyrine, que Derrien (26) a retrouvée dans le liquide amniotique, doué souvent de fluorescence rouge.

Mais, à côté de ces porphyrines d'élimination, il en existe d'autres que l'on trouve au contraire dans les tissus jeunes en voie de formation. On a remarqué la fluorescence rouge que présentent,

en lumière de Wood, les os en voie d'ossification ; dans le crâne, les fontanelles gardent longtemps cette fluorescence. Derrien (27) a constaté des faits analogues avec les dents du cobaye nouveau-né qui présentent, à l'ultra-violet, une coloration rouge vif. De même, la base des piquants du jeune hérisson et celle des plumes du jeune pigeon (*) montrent une fluorescence rouge, que l'on retrouve dans la glande de Harder, située dans l'orbite du rat et de la souris. Mais, tandis que Derrien (95) assimilait cette porphyrine à la protoporphyrine, Fabre et Simonnet (54), par la courbe spectrophotométrique de sa fluorescence, l'identifient complètement à l'hématoporphyrine.

On peut rapprocher des porphyrines accompagnant la calcification, celle des coquilles de l'œuf. Elle se trouve tout d'abord localisée, comme l'ont montré les travaux histologiques de Turchini (138), dans les cellules épithéliales de l'utérus, sous forme de granulations brunes qui passent dans la coquille au moment où le calcaire est secrété. Cette porphyrine, nous l'avons vu, est identique à la protoporphyrine, celle qui, unie au fer, constitue l'hématine, substance-mère de l'hémoglobine.

Certains microbes peuvent produire une porphyrine aux dépens de l'hémoglobine. On connaît la porphyrine de Kämmerer qui se forme dans les cultures sur bouillon-sang ou dans le sang lui-même, abandonné à la putréfaction ; elle a été assimilée à cette même protoporphyrine. Policard (113) a signalé également la fluorescence rouge intense des tissus cancéreux dans le sarcome du rat, fluorescence due vraisemblablement à la présence d'une porphyrine pathologique. Peut-être pourrait-on en rapprocher la porphyrine des dents cariées, décelable en lumière de Wood, sous forme de points rouge vif, dans les chicots dentaires (Loos) (93).

Il faut citer enfin la porphyrine de l'ostéochromatose, affection congénitale de l'homme, dans laquelle les os prennent une coloration brun acajou et deviennent fluorescents. Fink et Fraenkel (58) ont reproduit cette maladie en injectant à des cobayes de l'uroporphyrine, extraite de l'urine humaine.

A côté de ces porphyrines, il en existe d'autres dans certains organismes, sur la signification desquelles on possède peu de renseignements. Mac Munn en avait signalé la présence dans les téguments d'*Uraster rubens*, dans le manteau d'un lamellibranche :

(*) Une porphyrine analogue, très soluble dans l'éther additionné d'acide acétique persiste, à l'âge adulte, dans les plumes de certains oiseaux de nuit (*Athene noctua*, *Asio flammeus*) où sa présence serait l'indice de l'étiologie particulière de ces oiseaux (Derrien) (28).

« *Solenocurtus strigillatus* », sur la ligne dorsale brune du « *Lumbricus terrestris* ». Cette dernière a été étudiée récemment par Dhéré (41), de même qu'une autre renfermée dans les téguments d'« *Arion rufus* » (35).

Jusqu'à ces dernières années, les porphyrines semblaient spéciales au règne animal ; on n'en connaissait encore aucun représentant chez les végétaux, lorsque H. Fischer (67) et H. Königsdörffer (85) démontrèrent l'existence de coproporphyrine dans les cellules de levure de bière. R. Mayer (97) et H. Fink en ont fait (1928-29) une étude approfondie tandis que H. Fischer et Schwerdtel (64), poursuivant leurs recherches, caractérisaient la protoporphyrine dans les jeunes plantules de légumineuses (fèves, pois, haricots). Tout récemment enfin, Ch. Dhéré, S. Glücksmann et L. Rapetti (45), ont décelé la présence de porphyrines chez les bactéries et les champignons inférieurs. Le B. C. G. de Calmette, cultivé sur pomme de terre, leur a donné, au moyen d'un dispositif spécial, le spectre de fluorescence de la coproporphyrine, tandis que certains « *Penicillium* » et « *Sporotrichum* » donnaient de plus celui de la protoporphyrine. Coulter et Stone ont rencontré également dans les filtrats de cultures du bacille diphtérique, un complexe de porphyrine dont la concentration paraît proportionnelle à celle de la toxine. Ce complexe, renfermant du fer et du cuivre, semble être un dérivé du cytochrome. Si on rapproche enfin des porphyrines ce cytochrome de Keilin (82) qui s'y apparente certainement et dont la répartition est très vaste dans tout le règne végétal, on aura une idée de l'importance que présentent les porphyrines dans la nature et de leur rôle, qui pour être encore à peu près inconnu, n'en apparaît pas moins comme très grand.

RECHERCHES PERSONNELLES

Plan

Les recherches exposées dans la première partie de ce travail ont pour but :

1° L'étude des porphyrines renfermées dans la coquille de différents œufs d'oiseaux, et des pigments qui les y accompagnent. (Chapitre III).

2° L'étude des complexes métalliques fluorescents de l'ooporphyrine, comparés à ceux de l'hématoporphyrine. (Chapitre IV).

3° L'action des rayons ultra-violets sur les porphyrines et les pigments qui s'y apparentent, chimiquement ou biologiquement. (Chapitre V).

4° Une étude sommaire des substances fluorescentes des parties internes de l'œuf (vitellus et albumen). (Chapitre VI).

Les Porphyrines et les pigments biliaires de la coquille d'œuf

I. - L'œuf de poule

Chacun a pu remarquer que l'œuf de poule (*Gallus domesticus*) présentait une coloration allant du blanc pur au brun foncé, avec tous les termes intermédiaires. Si l'on examine ces œufs de teinte variée en lumière de Wood, on observe une fluorescence allant du rose clair pour les œufs à coquille blanche jusqu'au grenat foncé pour ceux dont la coquille est fortement colorée (*). Parfois même, dans les œufs fortement pigmentés, on observe, à la surface de la coquille, des granulations foncées qui leur donnent un aspect moucheté. A quoi sont dues ces colorations ? On remarque bien vite que, dans les œufs à coquille très brune, cette teinte n'est que superficielle. En effet, si on plonge l'œuf tout entier dans une solution diluée d'acide chlorhydrique, en quelques instants, cette couche foncée est dissoute tandis que flottent dans le liquide des filaments membraneux détachés de la cuticule. En même temps, apparaît une nouvelle couche calcaire beaucoup moins foncée que la première et qui ne dépasse jamais une teinte bistre assez claire. Le pigment brun semble donc localisé surtout dans la cuticule externe, de nature mi-calcaire, mi-albuminoï-

(*) La fluorescence de la coquille s'atténue avec le temps et finit même par disparaître, ce qui a pu faire croire qu'elle était fonction de l'âge de l'œuf. En réalité, si l'œuf est conservé à l'obscurité complète, sa coquille reste très longtemps fluorescente, tandis qu'à la lumière et surtout au soleil, elle perd très vite cette propriété. Le pigment fluorescent est donc fragile à la lumière qui le détruit rapidement.

dique ; il en reste toutefois une petite quantité dans les couches profondes de la coquille. Mais, c'est le pigment brun de la couche externe que j'ai tout d'abord cherché à isoler, à cause de son abondance et surtout du fait que les œufs très bruns sont relativement rares.

a) *Extraction de la Porphyrine*

Des œufs fortement colorés, originaires de Vendée, sont plongés dans la solution suivante :

{ Alcool éthylique	3 volumes
{ Acide chlorydrique pur	1 volume

on les y laisse juste le temps nécessaire (quelques secondes) pour que la pellicule externe très brune soit dissoute. Il faut dans ce but environ 7 à 8 cc. de liqueur acide par œuf. Tous les liquides d'extraction sont réunis et filtrés à la trompe sur coton de verre pour séparer les membranes : on obtient ainsi une solution carminée présentant déjà à la lumière du jour une fluorescence rouge intense. Cette solution est additionnée de trois fois son volume d'eau distillée et portée dans une ampoule à décantation avec un volume de chloroforme pur. L'ampoule est renversée, puis redressée lentement un certain nombre de fois jusqu'à ce que tout le pigment rose soit passé dans la couche chloroformique. Le chloroforme est recueilli par décantation, filtré et évaporé sous pression réduite jusqu'à siccité. Le résidu brun verdâtre est repris par la quantité minima d'éther sulfurique pour le dissoudre. Cet éther est agité ensuite avec un volume double d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5 % ; cette opération a pour but d'éliminer l'acide que la porphyrine aurait pu entraîner. La solution éthérée de porphyrine est lavée à plusieurs reprises avec de l'eau distillée, puis déshydratée par un séjour de quelques heures sur du sulfate de sodium desséché. Elle est enfin filtrée et abandonnée à l'évaporation lente dans un becher imparfaitement bouché. Au bout de quelques jours, se déposent des cristaux microscopiques d'Ooporphyrine présentant l'aspect d'aiguilles brunes, à faces losangiques et fréquemment groupées en amas (Pl. IV, fig. 1).

Cette méthode d'extraction par le chloroforme est commode et

présente, sur celle de Fischer et Kögl (59), l'avantage de ne pas altérer le pigment par des précipitations et des neutralisations successives de la liqueur-mère.

J'ai ensuite traité de la même manière les œufs précédents, privés de leur couche brune externe, pour extraire la porphyrine renfermée dans la masse de la coquille. L'opération a été plus laborieuse, en raison de la faible concentration du pigment ; j'ai pu cependant, en partant de 40 œufs, obtenir encore quelques milligrammes d'une ooporphyrine cristallisée qui s'est montrée identique à celle retirée de la couche externe. En résumé, la quantité moyenne de porphyrine extraite de la totalité d'un œuf de poule, à coquille très brune, s'est élevée à environ deux milligrammes.

b) *Essais d'extraction par d'autres solvants*

La même méthode d'extraction, décrite ci-dessus, a été employée en substituant l'acétone à l'acool éthylique. Les résultats ont été les mêmes et la porphyrine obtenue a présenté des caractéristiques spectrales absolument identiques, ce qui montre bien que l'usage, comme solvant, de l'alcool éthylique conduit à l'ooporphyrine et non à un éther éthylique, comme on pourrait le croire de prime abord. Il est de même vraisemblable que le chlorhydrate de porphyrine primitivement formé est dissocié au moment de la neutralisation par $\text{CO}^3 \text{NaH}$ de sa solution éthérée ; le pigment cristallisé auquel on aboutit paraît donc bien être l'ooporphyrine pure.

Des essais de substitution d'autres acides à l'acide chlorhydrique primitivement choisi, n'ont été guère encourageants.

L'acide sulfurique donne avec le carbonate de chaux de la coquille du sulfate de calcium qui, insoluble dans l'alcool, entrave la bonne marche de la réaction. Il est à craindre de plus qu'il n'altère la porphyrine, sitôt mise en liberté, par suite de ses propriétés déshydratantes énergiques.

L'acide azotique, additionné d'alcool éthylique, dissout de façon satisfaisante la coquille, mais il présente l'inconvénient d'altérer rapidement la porphyrine, qu'il transforme en un pigment vert, non fluorescent, peut-être analogue aux chlorines et

aux verdines que les porphyrines donnent avec les oxydants énergiques.

Il fallait donc revenir au mélange HCl-alcool qui s'était montré à tous points de vue satisfaisant.

c) Spectres de fluorescence de l'Ooporphyrine de poule

L'ooporphyrine cristallisée a été dissoute, à une concentration de 1 p. 20.000, dans les deux solvants suivants :

a) HCl à 25 % dans l'alcool (solution acide)

b) chloroforme pur (solution neutre).

Ces deux solutions, irradiées suivant la technique décrite au chapitre I, ont donné deux spectres différents et présentant chacun les caractères suivants :

1° Spectre en solution acide. — Il est constitué par trois bandes d'intensité égale (Pl. I, fig. 1).

Bande I, très forte	594-614 $m\mu$ (axe = 605 $m\mu$)
Bande II, très faible	621-632 $m\mu$ (axe = 626,5 $m\mu$)
Bande III, faible	651-665,5 $m\mu$ (axe = 658,5 $m\mu$)

C'est le même spectre caractéristique (type II Dhéré) que nous retrouverons, avec de légères variantes dans la position des axes, pour les porphyrines extraites des œufs de différents oiseaux.

2° Spectre en solution neutre. — Il est formé d'une bande principale très forte, accompagnée, si l'on prolonge le temps de pose, de deux bandes secondaires, de plus en plus faibles, à mesure que l'on approche de l'infra-rouge. Les positions respectives de ces bandes sont les suivantes (Pl. I, figure 2).

Bande I forte	617,5-649 $m\mu$ (axe = 633 $m\mu$)
Bande II faible	659-668,5 $m\mu$ (axe = 663,5 $m\mu$)
Bande III très faible	667-687 $m\mu$ (axe = 682 $m\mu$)

C'est là, typique, le spectre d'aspect cannelé, déjà signalé par Dhéré (type I Dhéré).

d) *Porphyrine de l'œuf de poule à coquille blanche*

Derrien avait indiqué que l'œuf de poule était toujours fluorescent en lumière de Wood, même lorsque sa coquille, parfaitement blanche, paraît ne contenir aucune trace de porphyrine ; sa fluorescence présente alors une coloration rose pâle. J'ai donc essayé, en partant d'une trentaine d'œufs choisis parmi les plus blancs, d'extraire une quantité de porphyrine suffisante pour pouvoir enregistrer le spectre de fluorescence. En employant la méthode d'extraction précédemment décrite, j'ai pu arriver, après une concentration très poussée des liqueurs-mères, à obtenir 3 cc. d'une solution chloroformique de porphyrine, à peine colorée, mais fortement fluorescente en rose vif. Le spectre obtenu présentait les caractères suivants en milieu neutre (Pl. I, fig. 3).

Bande I, très forte	614,5-636,5 m μ (axe = 626,5)
Bande II, faible	651-660 m μ (axe = 655,5)

Si on confronte ces chiffres avec ceux que l'on obtient en partant de la porphyrine d'œufs fortement colorés, on constate qu'il n'y a plus coïncidence des bandes de fluorescence. Le spectre que donne la porphyrine des œufs à coquille blanche se rapproche par contre beaucoup de celui de l'hématoporphyrine, en solution neutre. La seule cause d'erreur possible pourrait être la présence dans la coquille, d'une petite quantité de coproporphyrine, dont la position des bandes de fluorescence est assez voisine de celles de l'hématoporphyrine ; mais les chiffres donnés par E. Bois (16) pour cette dernière et ceux que j'ai obtenus moi-même, ne laissent aucun doute à cet égard. Si on compare de plus les couleurs de fluorescence, on voit que la teinte rose vif donnée par la porphyrine d'œuf blanc paraît identique à celle de l'hématoporphyrine, alors que celle de l'ooporphyrine vraie, même en solution diluée, est beaucoup plus rouge. Il semble donc bien que la porphyrine contenue en très petite quantité dans les œufs blancs peut être assimilée à l'hématoporphyrine, déjà identifiée à l'état naturel, par Fabre et Simonnet, dans la glande de Harder des rongeurs. Sans doute, une analyse élémentaire permettrait-elle de résoudre au point de vue chimique la question, mais elle exigerait, à cause de leur pauvreté extrême en porphyrine, le traitement d'un nombre considérable d'œufs blancs. D'ailleurs, les caractères physiques mentionnés plus haut sont suffisamment démonstratifs pour permettre, à ce sujet, une conclusion probante, sur laquelle nous reviendrons plus loin.

e) *Le Fer dans les coquilles d'œufs de poule*

D'après H. Fischer (*), le pigment des coquilles d'œuf pourrait être le sel de Fer d'une porphyrine. Cela paraît, de prime abord, peu vraisemblable ; toutes les combinaisons actuellement connues des porphyrines avec le fer sont dénuées de fluorescence ; or la porphyrine des coquilles est fluorescente « in situ ». J'ai cherché cependant quelle pouvait être la proportion de fer renfermée dans la coquille d'un œuf très coloré et dans celle d'un œuf parfaitement blanc. Ce fer a été dosé colorimétriquement, au moyen d'une solution de sulfocyanure de potassium (méthode Lapicque modifiée) dans les cendres provenant de la calcination d'une seule coquille, et dissoute dans HCl 2 N. La solution-étalon a été préparée avec un poids donné de fil de clavecin. Les résultats obtenus ont été les suivants :

Pour l'œuf à coquille très brune, la quantité de Fer s'élevait à 0 mgr 145, pour un poids de calcaire voisin de 7 gr. 50.

Pour l'œuf à coquille blanche, le fer n'existait qu'à l'état de traces tellement faibles qu'il a été impossible de le doser exactement. Tout au plus, peut-on l'estimer à quelques millièmes de milligramme.

Il semblerait donc qu'il y ait un certain rapport entre la quantité de fer et la proportion de porphyrine dans la coquille d'un œuf donné. De plus, si l'on s'adresse à un œuf très pigmenté, particulièrement riche en ces deux constituants, on voit que le

rapport $\frac{\text{Fer}}{\text{Porphyrine}}$ est très voisin de celui que l'on trouve pour

l'hématine. En effet cette dernière, pour un poids moléculaire de 633, renferme une molécule de porphyrine soit 560, un atome

de Fer 56 et un oxhydrile. Le rapport $\frac{\text{Fer}}{\text{Porphyrine}}$ est donc exac-

tement $\frac{1}{10}$. En ce qui concerne la coquille, il a été trouvé un poids

de fer égal à 0 mgr 145, alors que la quantité de porphyrine peut varier de 1 gr 5 à 2 milligrammes au plus ; le rapport $\frac{\text{Fer}}{\text{Porphyrine}}$

(*) Cité d'après J. Verne, p. 63 (143).

oscille entre $\frac{1}{10}$ et $\frac{1}{14}$. Si l'on admet une certaine latitude dans les chiffres, tout à fait inévitable lorsqu'on s'adresse à des produits biologiques, ces rapports apparaissent singulièrement voisins. On peut en déduire les deux conclusions suivantes :

1° Dans la coquille de l'œuf se trouve une hématine, dissociée en ses deux éléments : fer et porphyrine, puisqu'elle a conservé la fluorescence caractéristique de la porphyrine libre (*).

2° Cette hématine provient très certainement de l'hémoglobine de l'oiseau. Dissociée pour une cause inconnue au moment de la formation de la coquille, ses deux constituants : porphyrine et fer ont été entraînés par le calcaire, le fer vraisemblablement à l'état de carbonate, tandis que la porphyrine se répartissait, surtout à la surface de l'œuf, en une mince couche brune.

Quoi qu'il en soit, l'élimination dans la coquille d'un seul œuf d'une telle quantité de porphyrine correspond nécessairement à la destruction d'une quantité notable d'hémoglobine, surtout si ce fait se reproduit chez l'oiseau pendant toute la période de ponte. Si on admet pour l'hémoglobine de poule, un poids moléculaire voisin de celui que Svedberg a déterminé par ultra-centrifugation pour l'hémoglobine de cheval (68.000), on doit évaluer le taux d'hémoglobine ainsi détruite, presque journellement, à plus d'un décigramme, ce qui, pour un animal de cette taille, n'est pas négligeable.

II. - L'œuf de mouette

La mouette argentée ou goéland (*Larus argentatus*, var. *Michaellesi*) se rencontre en abondance dans certaines îles désertes (Riou, Grand Conclu) de la rade de Marseille, où elle fait deux pontes par an. Ses œufs sont volumineux, deux fois plus gros en moyenne qu'un œuf de poule et pèsent environ 100 grammes. La coquille est vert foncé, parsemée de taches tantôt claires, tantôt noires comme du goudron ; quoique épaisse, elle est assez fragile et la texture du calcaire paraît moins compacte que dans l'œuf de poule.

Ayant pu récolter un grand nombre de ces œufs (250 environ), il m'a été possible d'en étudier les pigments de façon plus approfondie que ne l'avaient fait Fischer et Kögl pour la porphyrine et Lemberg pour l'oocyan, sur les œufs d'une espèce voisine de la mer du Nord.

(*) Derrien par contre n'a pas trouvé de fer juxtaposé à la porphyrine dans la glande de Harder des rongeurs, ce qui assignerait à cette porphyrine une autre origine que celle de l'ooporpyrine (25).

a) *Extraction de la Porphyrine et de l'Oocyan (*)*

Bien que l'œuf de mouette ne présente qu'une fluorescence assez faible en lumière de Wood, il renferme dans sa coquille des quantités relativement considérables de porphyrine. Mais elle est si étroitement accolée au pigment vert, qui présente les mêmes caractères de solubilité, qu'il est très difficile de les séparer parfaitement, d'autant plus que l'oxydabilité de l'« oocyan » le rend très fragile aux réactifs chimiques. Lemberg (92) a indiqué dans ce but plusieurs méthodes assez laborieuses et qui ne visent qu'à conserver l'oocyan, au détriment de la porphyrine, considérée comme un résidu gênant. Comme il me fallait extraire et séparer les deux pigments, j'ai dû mettre au point une technique qui, utilisant leur inégale solubilité dans l'éther, à des pH différents, m'a permis de les isoler de façon satisfaisante.

Technique. — Les œufs sont immergés dans le mélange suivant :

alcool éthylique	3 parties
acide chlorhydrique pur	1 partie

Lorsque la coquille est presque entièrement dissoute et que la membrane coquillière commence à apparaître, on sort ces œufs avec précaution pour les remplacer par d'autres, jusqu'à ce que l'attaque du calcaire se ralentisse par épuisement de l'acide. On laisse alors quelques fragments de coquille plusieurs heures, en contact avec le liquide d'extraction, de telle sorte qu'il reste toujours un excès de calcaire non attaqué. La liqueur obtenue, douée d'une belle couleur verte, est filtrée à la trompe sur du coton de verre, pour la débarrasser des membranes ; elle n'est plus que faiblement acide ($\text{pH} \approx 3$ environ) et possède une fluorescence rouge sombre. Un litre d'alcool chlorhydrique suffit pour dissoudre la coquille de 25 à 30 œufs de mouette, suivant la grosseur.

La séparation des deux pigments, que la solution de calcaire renferme en quantité sensiblement égale, est basée sur ce fait qu'en milieu très acide, à $\text{pH} = 1$ environ, l'oocyan est seul à passer dans l'éther d'extraction. Si l'acidité décroît jusque vers $\text{pH} 3$, la porphyrine commence également à être entraînée : à $\text{pH} 4$, sa solubilité

(*) « Oocyan » est le terme employé par Lemberg, que je n'ai pas cru devoir « franciser ». Il est identique à « oocyanine » employé par quelques rares auteurs de langue française.

dans l'éther est telle qu'il n'en reste plus que des traces dans la liqueur-mère. Le mode opératoire suivant est basé sur ces propriétés.

On prélève 80 cc. du liquide d'extraction filtré, auxquels on ajoute 25 cc. du mélange alcool + HCl à 25 %. Le tout est introduit dans une ampoule à décantation avec 70 cc. d'éther sulfurique ; on verse alors, dans ce mélange homogène, de l'eau distillée par petites portions jusqu'à ce que l'éther se sépare, coloré en vert-bleu, tandis que la couche inférieure montre une teinte rose verdâtre ; il faut environ 50 cc. d'eau distillée. On décante l'éther qui a entraîné à peu près tout l'oocyan et très peu de porphyrine : il ne donne en effet qu'une fluorescence assez faible en lumière de Wood. On l'agite à plusieurs reprises avec du sulfate de sodium desséché pour le déshydrater soigneusement et il est ensuite filtré et évaporé sous pression réduite, à la température ordinaire, jusqu'à siccité. Le résidu est lavé rapidement à l'éther de pétrole, puis à l'éther ordinaire qui enlève les dernières traces de porphyrine. Il est ensuite dissous dans un mélange à parties égales d'alcool éthylique et d'éther que l'on abandonne à l'évaporation spontanée : l'oocyan se précipite en flocons verts très altérables.

Le résidu primitif d'épuisement par l'éther est de nouveau agité avec 30 cc. d'éther qui enlève à peu près tout ce qui reste d'oocyan. Cet éther est décanté et rejeté. On ajoute alors 30 cc. d'une solution d'acétate de soude à 50 %, puis 40 cc. d'éther. On renverse un certain nombre de fois l'ampoule à décantation jusqu'à ce que l'éther se sépare, fortement coloré en rose par la porphyrine qui, à la faveur d'une acidité ionique bien moindre, est passée dans ce solvant. On décante l'éther et on le lave rapidement avec de l'acide chlorhydrique à 2 %, pour enlever les dernières traces d'oocyan. Il est ensuite desséché soigneusement sur du sulfate de sodium anhydre, après un dernier lavage avec une solution de bicarbonate de sodium à 5 %, puis abandonné à une évaporation très lente : l'ooporphyrine cristallise peu à peu en aiguilles brun noir.

b) Spectres de fluorescence de l'Ooporphyrine de mouette

a) En milieu acide. — Déterminé, comme pour l'ooporphyrine de poule, avec une solution dans HCl 2 N. On retrouve les trois bandes d'inégale intensité, la plus faible se trouvant entre les deux autres, la plus forte au début de l'orangé. Leurs axes respectifs sont :

1 ^{re} bande	(593,5—612,5) λ = 604,5 m μ
2 ^e bande	(622,5—631,5) λ = 627 m μ
3 ^e bande	(649—668,5) λ = 659 m μ

coïncidant parfaitement avec les chiffres donnés par la porphyrine d'œuf de poule brun.

b) En milieu neutre. — Le spectre, obtenu avec une solution de porphyrine dans l'éther sulfurique soigneusement neutralisée, apparaît formé d'une forte bande d'axe :

$$\lambda = 632,5 \mu (616,5 - 648,5)$$

avec les mêmes cannelures, atténuées du côté de l'infra-rouge, que nous avons observées avec l'ooporphyrine de poule.

D'autres spectres ont été enregistrés, en opérant avec des solutions d'ooporphyrine dans le chloroforme, la pyridine, etc. Ils ne présentaient aucune différence avec les spectres correspondants, donnés par la porphyrine d'œuf de poule brun. L'identité de ces deux pigments paraît donc démontrée par la méthode spectrographique.

c) *Propriétés de l'Oocyan*

L'oocyan est un corps très oxydable, pouvant cristalliser, dans une atmosphère d'azote, en lamelles bleu foncé ou en aiguilles bleu-vert, groupées par 2 ou 3 et douées d'un fort dichroïsme ; elles fondent à 233° en un liquide brun noir. L'oocyan est très soluble dans le chloroforme et dans l'alcool avec une coloration bleu-vert, dans l'éther avec une coloration bleu franc, très soluble dans l'éther de pétrole. Il ne peut se conserver longtemps qu'en solution alcoolique, acidulée par Hcl, et gardée à l'abri de la lumière. Lemberg (92), en partant de cinq kilos de coquilles d'œuf de mouette, a obtenu 50 milligrammes d'éther méthylique de l'oocyan, qui lui ont permis d'en faire une micro-analyse élémentaire : il attribue à ce corps les deux formules possibles : $C^{37} H^{42} N^4 O^8$ ou $C^{28} H^{33} N^3 O^6$.

L'oocyan donne avec le nitrite de soude, en milieu acide, la réaction de Gmelin, ce qui l'apparente aux pigments biliaires : Lemberg ne le croit pas cependant identique à la biliverdine, mais plutôt constitué d'une chaîne tripyrrolique fermée. Par contre, Barcroft et Keilin (4), ont isolé du placenta de chienne un pigment vert, extrêmement voisin de l'oocyan, qu'ils ont nommé utéro-verdine et dont le noyau serait formé d'une chaîne tétrapyrrolique ouverte. La question n'est donc pas encore résolue.

d) *Spectres de l'Oocyan*

a) Absorption. — En solution dans l'alcool éthylique, l'oocyan ne présente pas de spectre d'absorption caractéristique. A peine peut-on noter un léger minimum à $480\text{ m}\mu$ et un faible maximum entre 670 et $680\text{ m}\mu$.

b) Fluorescence. — Les solutions d'oocyan ne possèdent aucune florescence en lumière de Wood, mais son dérivé zincique présente, en milieu ammoniacal, une belle fluorescence rouge qui sera étudiée dans le chapitre IV de ce travail.

e) *Présence du fer dans la coquille de l'œuf de mouette*

L'œuf de mouette renferme dans sa coquille, comme l'œuf de poule brun, une petite quantité de sels de fer. Dosés par la méthode déjà décrite, ils correspondent à un poids de fer évalué à 0 milligramme 265, pour un œuf dont la coquille pesait sensiblement 10 grammes. La proportion de fer est donc assez voisine de celle que l'on rencontre dans l'œuf de poule.

III. - L'œuf de Cane

L'œuf de cane (*Anas boschas*) présente des colorations très variées. Blanche parfois et translucide comme de l'albâtre, sa coquille est plus souvent verdâtre ; assez rarement, elle peut être d'un rose plus ou moins vif ou même jaune légèrement orangé. D'une manière générale, il semble que la coquille soit plus verte dans les variétés sauvages ou les sujets vivant habituellement sur l'eau. Tous ces œufs présentent en lumière ultra-violette une fluorescence rose peu intense et il faut traiter des quantités assez importantes de coquilles pour obtenir des traces de porphyrine : dix œufs m'ont été nécessaires pour pouvoir enregistrer son spectre de fluorescence. D'après Fürreg (cité par Dhéré) (43), ce spectre serait tout à fait différent de celui que donne l'œuf de poule. Dans tous les essais que j'ai faits et en opérant avec des œufs de provenances diverses, il s'est montré effectivement différent du spectre obtenu avec l'œuf de poule brun, mais plus voisin de celui que donne l'œuf de poule blanc. Les chiffres obtenus, en milieu acide, sont les suivants (Pl. I, fig. 6) :

Bande I :	590 — 612 $\text{m}\mu$	(axe = 601 $\text{m}\mu$)
Bande II :	624 — 635 $\text{m}\mu$	(axe = 629 $\text{m}\mu$)
Bande III :	653 — 663 $\text{m}\mu$	(axe = 658 $\text{m}\mu$)

En milieu neutre, on peut constater des divergences analogues, l'axe de la bande principale se trouve à :

$\lambda = 627 \text{ m}\mu$ au lieu de :

$\lambda = 633 \text{ m}\mu$ pour l'œuf de poule brun

et $\lambda = 625,5 \text{ m}\mu$ pour l'œuf de poule parfaitement blanc.

La porphyrine de l'œuf de cane se rapproche donc beaucoup plus de l'hématoporphyrine que de l'ooporphyrine, par les caractéristiques de son spectre de fluorescence.

Il faut signaler également dans l'œuf de cane à coquille verdâtre, la présence en faible quantité d'un pigment tout à fait identique à l'oocyan. On peut le séparer de la porphyrine, en opérant comme pour l'œuf de mouette, et en faire un dérivé zincique qui présente, en milieu ammoniacal, une fluorescence rouge assez forte. Dans certains œufs de cane, assez rares, teintés en rose chair, j'ai pu isoler de la coquille, des traces d'un pigment non fluorescent et différent des porphyrines. Ce pigment, coloré en rose carmin, paraît bien être un produit d'origine biliaire, terme de transformation vraisemblable de l'oocyan.

IV. - L'œuf de Cygne

Beaucoup plus gros que l'œuf de cane et pesant parfois jusqu'à 350 grammes, l'œuf de cygne blanc (*Cygnus olor*) possède une coquille très épaisse et relativement très lourde (50 grammes), se rapprochant déjà de celle de l'œuf d'autruche. Cette coquille, colorée en gris vert, présente en lumière de Wood une fluorescence assez faible ; dissoute dans le mélange alcool éthylique — HCl à 25 %, elle donne une liqueur vert clair, pauvre en porphyrine, mais colorée par un pigment qui est très vraisemblablement identique à l'oocyan. La porphyrine extraite par le chloroforme et redissoute dans un peu d'alcool chlorhydrique a donné un spectre de fluorescence à trois bandes dont les axes sont les suivants (Pl. I, fig. 7):

Bande I : axe = $602,5 \text{ m}\mu$ (591 — 613,5)

Bande II : axe = $630,5 \text{ m}\mu$ (624 — 635)

Bande III : axe = $657,5 \text{ m}\mu$ (650 — 665)

A en juger par ces chiffres, la porphyrine de l'œuf de cygne peut être considérée comme identique à celle de l'œuf de cane.

V. - L'œuf de Dinde et de Pintade

Ces deux œufs présentent, à part des différences de grosseur, des caractères communs : tous deux sont parsemés de taches foncées, très petites, qui leur donnent un aspect moucheté, tandis que le fond de la coquille présente une teinte beige clair. Dissoutes dans l'alcool additionné d'acide chlorhydrique, ces coquilles donnent une liqueur riche en porphyrine qui, ici, se rapproche beaucoup par ses caractéristiques spectrales, de l'ooporphyrine typique. En effet, les axes des trois bandes de fluorescence (spectre acide) sont les suivants (Pl. I, fig. 8) :

	Dinde (<i>Meleagris gallopavo</i>)	Pintade (<i>Numida meleagris</i>)
Bande I : axes =	604,5 m μ	604 m μ
Bande II : axes =	626,6 m μ	628,5 m μ
Bande III : axes =	656,5 m μ	657,5 m μ

À part la porphyrine, il n'a pas été possible, dans chacun de ces deux œufs, de rencontrer d'autre pigment.

VI - L'œuf de Thalassidrome

Le thalassidrome (*Hydrobates pelagicus*) est un oiseau marin assez rare, de la grosseur d'un pigeon, et qui possède un plumage entièrement noir. Il vit dans certaines îles désertes de la Méditerranée, tapi tout le jour dans un creux de rocher d'où il ne sort que la nuit pour aller chercher les poissons dont il fait sa nourriture habituelle. Lorsqu'on le saisit au nid, il rejette aussitôt par le bec un liquide jaune, riche en pigments biliaires et doué d'une odeur forte très désagréable. C'est la même odeur, rappelant celle de la souris, que possèdent les œufs, pondus dans les anfractuosités du rocher. Ces œufs, de la grosseur d'une noix, possèdent une coquille mince, parfaitement blanche et très peu fluorescente en lumière de Wood. En partant d'une vingtaine de ces œufs, j'ai pu obtenir cependant suffisamment de porphyrine pour en déterminer le spectre de fluorescence ; ce spectre s'est montré absolument identique à celui que donne la porphyrine d'œuf de poule blanc.

Autre fait intéressant à signaler : le thalassidrome est le seul, de tous les oiseaux marins, qui ponde des œufs entièrement blancs et dépourvus de pigments biliaires.

J'ai étudié également les œufs de nombreux autres oiseaux qui tous renfermaient dans leur coquille des quantités, extrêmement variables, d'une espèce à l'autre, de porphyrine et de pigments biliaires. Sans entrer dans le détail de chacun de ces œufs, ce qui entraînerait trop loin, qu'il suffise de les classer par catégories, suivant la nature et les caractères spectrographiques de leurs pigments :

A) *Hématoporphyrine ; traces d'Oocyan.*

Œufs de pluvier (*Pluvialis apricarius*).

— de râle d'eau (*Rallus aquaticus*).

— de geai (*Garrulus glandarius*).

B) *Ooporphyrine seule.*

Œufs de faisan (*Phasianus colchicus*).

— de perdrix (*Perdix rubra*).

C) *Ooporphyrine ; traces d'Oocyan.*

Œufs de pie (*Pica candata*).

— de serin (*Serinus meridionalis*).

D) *Ooporphyrine et Oocyan abondants.*

Œufs d'avocette (*Recurvirostra avocetta*).

Ces derniers œufs sont tout à fait identiques, comme colorations, à ceux de goéland, mais beaucoup plus petits.

N.-B. — Bien qu'ils sortent du cadre de ce travail, limité aux seuls œufs d'oiseaux, j'ai recherché également la présence de porphyrine dans les œufs de chéloniens (tortue terrestre) et de crocodiliens (caïman). Tous deux possèdent une coquille entièrement blanche, douée d'une fluorescence rose très faible en lumière de Wood. Mais il ne m'a pas été possible de réunir suffisamment de matériaux, pour pouvoir enregistrer le spectre de fluorescence de leur porphyrine qui, selon toute vraisemblance, doit se rapprocher de celui de l'hématoporphyrine.

Conclusion

a) *Origine des Porphyrines de l'œuf*

Lorsque Fischer et Kögl ont étudié le spectre d'absorption de l'ooporphyrine retirée des œufs de nombreux oiseaux différents, ils ont trouvé, pour les deux bandes principales de ce spectre, des positions un peu variables d'un œuf à l'autre. Les limites extrêmes observées vont :

Pour la première bande, de $601,7 \text{ m}\mu$ à $604,5 \text{ m}\mu$.

Et pour la deuxième, de $556,7 \text{ m}\mu$ à $559,2 \text{ m}\mu$.

Nous avons pu constater des différences analogues dans le spectre de fluorescence de porphyrines extraites des mêmes œufs ou d'autres provenant d'espèces zoologiquement très voisines. Si on envisage les spectres obtenus en milieu acide, on voit nettement l'axe de la bande I se déplacer depuis $\lambda = 599,5 \text{ m}\mu$ (porphyrine de l'œuf de poule blanc) jusqu'à $\lambda = 605 \text{ m}\mu$ (porphyrine de l'œuf de poule brun) ; tandis que la bande III subit des variations équivalentes, allant de $\lambda = 654 \text{ m}\mu$ à $\lambda = 659 \text{ m}\mu$. Sur les spectres en milieu neutre, mêmes remarques : la bande principale située à $\lambda = 633 \text{ m}\mu$ pour l'œuf brun est décalée jusqu'à $\lambda = 625,5 \text{ m}\mu$ pour l'œuf à coquille blanche, position très voisine de celle que donne dans les mêmes conditions l'hématoporphyrine.

Or Königsdorfer a constaté que lorsqu'on mélange dans une solution une quantité équivalente de deux porphyrines différentes, deux cas peuvent se produire dans le spectre qui en résulte :

1° On obtient une double bande de fluorescence, si les deux bandes principales de chaque porphyrine sont normalement assez éloignées l'une de l'autre. C'est le cas de la coproporphyrine et de la protoporphyrine dont les axes (en solution neutre) respectivement situés à 620 et $634 \text{ m}\mu$ présentent entre eux un décalage de $140 \text{ \AA}$.

2° Pour un mélange au contraire de coproporphyrine et d'uroporphyrine (position des axes $= 620$ et $623 \text{ m}\mu$), dont les deux bandes de fluorescence ne sont séparées que par un intervalle de $30 \text{ \AA}$, le spectre obtenu ne montre qu'une seule bande large occupant la place des deux bandes prises isolément.

Un résultat analogue m'a été fourni par un mélange à parties égales de deux solutions, à 1 p. 10.000 dans l'alcool, d'ooporphyrine et d'hématoporphyrine. On obtient ainsi une seule bande de fluorescence produite par le déplacement l'une vers l'autre de deux bandes qui chevauchent partiellement et dont l'axe devient la résultante des deux précédents.

Ce phénomène permet de comprendre ce qui se passe avec les porphyrines extraites de différents œufs. Les variations observées

OoP.

dans le spectre de fluorescence viennent du rapport inégal ————

HématoP.

Si on envisage les cas extrêmes, on a :

a) Dans l'œuf à coquille blanche, le spectre typique de l'hématoporphyrine, car l'ooporphyrine en est absente ou ne s'y trouve qu'à l'état de traces insignifiantes ;

b) Dans l'œuf à coquille brune, on a par contre le spectre de l'ooporphyrine type, car l'hématoporphyrine qui y existe vraisemblablement en très faible quantité voit ses caractéristiques spectrales complètement étouffées par celles de l'ooporphyrine, incomparablement plus abondante.

Mais, à côté de ces cas extrêmes, il en existe d'autres, que représentent les œufs d'oiseaux variés, chez lesquels la proportion des deux porphyrines est essentiellement variable, ce qui explique les variations spectrographiques notables que l'on constate. En résumé, ces divergences atteignant aussi bien les spectres d'absorption que les spectres de fluorescence, ne peuvent s'expliquer que par la présence, dans les coquilles de l'œuf, de deux porphyrines différentes :

a) L'une, présentant les caractéristiques spectrales de l'hématoporphyrine, se trouverait en très petite quantité dans la coquille de tous les œufs dont elle serait un constituant normal.

b) L'autre, l'ooporphyrine de H. Fischer, absente dans les œufs à coquille blanche, se rencontrerait en quantité éminemment variable dans les autres pour atteindre une forte concentration dans la couche externe de ceux dont la coquille est fortement teintée de brun. Dans ce dernier cas, elle masquerait complètement les caractéristiques spectrales de l'hématoporphyrine, beaucoup plus diluée comparativement. Sans doute, serait-il désirable de pouvoir séparer les deux produits, mais l'opération apparaît comme difficile. En effet, quoique l'ooporphyrine soit chloroformosoluble et que l'hématoporphyrine en principe ne le soit pas, cette dernière est suffisamment soluble dans le chloroforme pour que les très faibles quantités contenues dans la coquille de l'œuf arrivent à y passer ; elle se retrouve alors avec l'ooporphyrine vraie dont elle modifie légèrement le spectre de fluorescence, ce qui explique les divergences constatées.

Ce principe de la dualité des porphyrines dans l'œuf une fois posé, il faudrait élucider l'origine de ces pigments. Ils proviennent, à n'en pas douter, de l'hémoglobine. Nous avons vu que l'on trouvait dans la coquille, par rapport à la porphyrine, une quantité de fer très voisine de celle qui entre dans la constitution de l'hématine. Au moment de la calcification, il y aurait dissocia-

tion de l'hémoglobine, puis de l'hématine elle-même : fer et porphyrine seraient alors entraînés dans la masse du calcaire fraîchement précipité, puis, avec plus d'abondance encore à la surface de la coquille, déjà terminée. Tout se ramènerait à une destruction d'hémoglobine, analogue à celle qu'engendre dans l'organisme l'ingestion de sulfonal ou de véronal, et parfois très importante. L'oiseau éliminerait par ses œufs, au moment de la ponte, une certaine quantité de porphyrine qui ne serait pour lui qu'une substance de déchet tout à fait accidentelle. Et c'est à cette porphyrine, ainsi qu'au carbonate de fer, répandus tous deux en couche très mince, mais particulièrement compacte, dans la cuticule de la coquille, que paraît due la coloration brune, plus ou moins foncée que présentent fréquemment les œufs d'oiseaux.

b) *Rôle Physiologique des Porphyrines de l'œuf*

Quelle peut-être la signification physiologique de ces porphyrines ?

En ce qui concerne l'hématoporphyrine, commune à tous les œufs, où elle est peu abondante, on pourrait admettre qu'elle joue là un rôle analogue à celui de la porphyrine que l'on rencontre dans les parties du squelette en voie d'ossification, dans les piquants du jeune hérisson ou les plumes du jeune pigeon, d'une porphyrine peut-être indispensable à la formation des os, comme à la calcification de la coquille. En réalité, il paraît certain que les porphyrines ne se trouvent dans les concrétions calcaires que si les organismes possèdent de l'hémoglobine dans leurs tissus. On est donc amené aux deux hypothèses suivantes :

a) Ou bien, la porphyrine ne représente qu'un produit d'excrétion et ne joue aucun rôle dans la calcification.

b) Ou bien les organismes, qui peuvent produire du calcaire sans hémoglobine et sans porphyrine, le font par un mécanisme tout différent de celui qu'utilisent dans ce but les animaux supérieurs.

J'ai recherché systématiquement la présence des porphyrines dans un grand nombre d'organismes animaux ou végétaux en voie de calcification. C'est ainsi que j'ai examiné notamment en lumière de Wood :

1° Des rameaux d'algues calcaires du genre *Lithothamnium*.

2° Le squelette calcaire en voie de formation de la seiche (*Sepia*).

3° Les piquants de l'oursin (*Paracentrotus lividus*).

4° La carapace du crabe et de la langouste.

5° La coquille de nombreux mollusques marins gastéropodes et lamellibranches (*) appartenant aux genres : *Pectunculus*, *Tellina*, *Halyotis*, *Cardium*, *Arca*, *Murex*, *Natica*, *Cypræa*, *Mitra*, *Trochus*, etc.

Dans aucune de ces parties calcaires, choisies intentionnellement chez des sujets dépourvus d'hémoglobine, il n'a été possible de découvrir la moindre trace de porphyrine, ce qui montrerait bien que, dans certains groupes zoologiques tout au moins, elle n'est pas indispensable à la formation des tissus calcifiés.

Si on envisage maintenant l'ooporphyrine vraie, renfermée en quantité relativement grande dans la couche externe des œufs bruns, son rôle apparaît plus réduit encore et limité vraisemblablement à un simple produit d'excrétion. Elle ne peut être en effet nécessaire à la calcification de la coquille, puisque certains oiseaux pondent toute leur vie des œufs parfaitement blancs. Bien mieux, on trouve chez la poule tous les intermédiaires entre l'œuf blanc et l'œuf à coquille brune, et cela parfois dans la même basse-cour. Il ne semble donc pas que la nourriture soit cause de cette excrétion porphyrique.

Peut-être la race et le climat interviennent-ils ? C'est un fait connu que les poules de race asiatique pondent de préférence des œufs teintés. D'autre part, c'est surtout dans l'Ouest de la France, en Vendée ou dans les Deux-Sèvres, que l'on trouve des œufs à coquille très brune, recherchés, paraît-il, des consommateurs en Angleterre.

(*) Dans un seul cas, j'ai rencontré chez quelques gastéropodes de la famille des Trochidés, une fluorescence rouge qui aurait pu faire croire à la présence de porphyrine. Cette fluorescence est due à un pigment rouge, déjà signalé par Krukenberg sous le nom de « Turbobromine » et qui constitue les taches d'ornementation de la coquille chez *Trochocochloa turbinata* et surtout *Clanculus pharaonis*. En dissolvant dans l'alcool — HCl à 25 % la couche calcaire externe de ce dernier mollusque, on obtient une liqueur rose douée d'une fluorescence rouge dont le spectre apparaît constitué de deux bandes ($\lambda = 657 \text{ m}\mu$ et $\lambda = 597 \text{ m}\mu$) dont les positions ne correspondent à celles d'aucune porphyrine. De plus, ce pigment ne passe dans aucun solvant organique et ne donne aucun complexe métallique. Il est rapidement détruit à la température de l'ébullition, tous caractères qui le séparent nettement des porphyrines et le rapprochent de certains chromoprotéides. Ce fait montre en tous cas, comme l'indiquait Derrien, qu'il ne faut pas attribuer *a priori* à des porphyrines toutes les fluorescences rouges rencontrées chez les êtres vivants.

Peut-être ce pigment est-il voisin de la rufescine, corps de nature protéique, mais possédant des groupements qui le rapprochent de l'urobiliné : il a été rencontré par Dhéré et Baumeler (35) dans les coquilles d'*Haliotis rufescens*.

Mais il est aussi un fait que de nombreuses statistiques faites chez des aviculteurs m'ont permis de constater : c'est que les œufs à coquille foncée paraissent provenir surtout de poules à plumage clair ou même entièrement blanc. Il est rare qu'une poule noire ponde des œufs très pigmentés alors que le fait est fréquent chez les blanches. On pourrait dès lors admettre que le plumage agit par sa plus ou moins grande perméabilité à la lumière et que la sécrétion d'ooporphyrine ne serait qu'une sorte d'état pathologique provoqué par une photosensibilisation plus ou moins intense de la poule.

c) *Signification des Pigments Biliaires de l'œuf*

Quant aux pigments de couleurs verte, bleue ou rose, identiques à l'oocyan ou en tous cas très voisins, que l'on trouve associés aux porphyrines dans certains œufs, ce sont certainement des produits d'excrétion d'origine biliaire. Il se pourrait même qu'ils soient tous des termes d'oxydation plus ou moins avancée d'un même pigment initial dérivé de la bilirubine. On sait en effet que la bilirubine peut s'oxyder facilement pour donner toute une gamme de colorations correspondant à des termes d'oxydation de plus en plus poussée : biliverdine verte, cholécyanine bleue, cholétéline rose, etc. Les réactions bien connues de Gmelin et d'Hammarsten sont basées sur cette propriété. Or, on peut trouver tous ces intermédiaires colorés dans la coquille de certains œufs d'oiseaux. Ceux de cane varient du verdâtre au rose tandis que ceux de geai ou d'étourneau sont d'un bleu intense.

Il est à remarquer que cette excrétion de pigments biliaires dans les coquilles paraît surtout importante chez les oiseaux marins : mouette, goéland, avocette, etc., qui possèdent cependant une vésicule biliaire et dont le sang ne renferme pas de bilirubine (*). Peut-être ces oiseaux rejettent-ils en permanence des pigments biliaires dans le cloaque, où ils se fixent alors par adsorption sur le calcaire encore mou de l'œuf, au moment de sa formation.

On sait d'autre part qu'il existe, outre une analogie de constitution chimique, une filiation très étroite entre pigments biliaires et porphyrines. Il est possible « in vitro », de passer des uns aux autres. De même, il se peut qu'« in vivo » les porphyrines soient, dans la désintégration successive des pigments sanguins, un terme

(*) Ainsi que j'ai pu m'en assurer, sur le plasma de goéland, au moyen de la technique de Van den Bergh.

de passage entre l'hémoglobine et les pigments biliaries. La coquille de l'œuf, chez certains oiseaux, serait en quelque sorte le témoin de ces transformations : sur elle se fixeraient, suivant le moment, soit des porphyrines, soit des pigments biliaries à différents stades d'oxydation, soit, dans certains cas, les deux réunis.

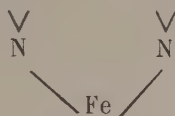
Ainsi se trouverait, d'une autre manière, confirmée l'hypothèse d'après laquelle la porphyrine de l'œuf, produit de déchet, sans signification physiologique dans la formation de la coquille d'œuf, serait fixée là en vertu seulement d'une affinité physique : le pouvoir adsorbant marqué du carbonate de calcium en voie de précipitation, à l'état naissant pour ainsi dire, vis à vis des porphyrines et des pigments biliaries. Une connaissance plus approfondie du métabolisme du calcium et des porphyrines dans l'organisme permettra peut-être de résoudre ce problème.

CHAPITRE IV

Les complexes métalliques des Porphyrines et de l'Oocyan

I. - Historique et Propriétés

Les porphyrines possèdent la remarquable propriété de donner, par substitution d'un atome de métal à deux de leurs atomes d'hydrogène, des complexes définis, très stables et bien cristallisés. A vrai dire, certains métaux seulement peuvent entrer ainsi en combinaison. Des travaux récents de Fischer, Treiho et Zeile (67) sur la constitution de l'hématine, il résulte que le métal, dans un tel complexe, est résumé par deux valences aux atomes d'azote de deux noyaux pyrroliques voisins :



Dans le cas du fer divalent relié à la protoporphyrine, on a un groupement qu'Anson et Mirsky (2) ont nommé un « hoem » et dont le chlorhydrate constitue l'hémine. Il est probable que les autres complexes des porphyrines possèdent une constitution analogue, ce qui expliquerait que seuls les métaux divalents, tels que Cu, Sn, Pb, Zn, etc., peuvent concourir à leur formation.

Les propriétés de ces complexes les rapprochent des porphyrines qui leur ont donné naissance ; ils possèdent les mêmes caractères de solubilité et cristallisent dans des systèmes identiques ou très voisins. Par contre, l'introduction d'un atome de métal étranger amène des modifications profondes de la fluorescence, dans les porphyrines ainsi transformées. Cette action peut se manifester de deux manières différentes :

a) Tantôt l'ion métallique provoque une extinction complète de la fluorescence, dont le nouveau complexe est dépourvu (Fe, Co, Ni, Cu, Ag).

b) Tantôt il n'occasionne que des modifications qualitatives dans le spectre de fluorescence de la porphyrine primitive (Sn, Pb, Cd, Zn). Nous reviendrons en détail sur cette importante propriété.

Le premier connu des complexes naturels des porphyrines a été l'hématine, dérivé ferrugineux de la protoporphyrine qui, associé à la globine, constitue l'hémoglobine. Beaucoup plus tard, Fischer (61) a découvert dans les plumes de certains oiseaux exotiques du genre *Turacus* (touracos) un pigment rouge, nommé turacine, qui résulte de la combinaison du cuivre avec l'uroporphyrine. Ces deux dérivés sont dénués de fluorescence.

Aussitôt qu'ont été connues les porphyrines artificielles, en particulier l'hématoporphyrine, on a essayé de les faire rentrer dans des complexes métalliques. Nencki et Sieber ont ainsi obtenu le dérivé zincique de l'hématoporphyrine, préparé ensuite par Mac Munn, Hammarsten, Garrod, Schumm et enfin Milroy (100) qui en a fait une étude détaillée. Ce dernier a indiqué de plus le mode d'obtention de plusieurs composés analogues, en particulier avec l'étain ; mais il n'a pas mentionné leur pouvoir fluorescent. Smadja (129), qui a appliqué la préparation du dérivé stanneux de l'hématoporphyrine à la recherche des taches de sang, en médecine légale, n'a pas vu non plus la fluorescence cependant intense de ce corps. C'est Dhéré qui, l'ayant observée le premier, en a déterminé le spectre en même temps que celui des trois autres complexes fluorescents de l'hématoporphyrine, préparés respectivement avec Zn, Cd, Pb. La thèse de Van der Bom renferme sur ce sujet des spectrographies remarquables (139).

Les dérivés métalliques des autres porphyrines sont, à part les deux que l'on rencontre dans la nature, moins bien connus. Hamsik signale le complexe stanneux de la protoporphyrine et en donne (75) la composition centésimale qui correspond à la formule



Les complexes préparés avec le chrome et le manganèse présentent la particularité d'être les seuls qui possèdent le pouvoir oxydo-réducteur du complexe ferreux (hémochromogène), mais ils ne peuvent cependant pas s'unir à la globine pour donner une sorte d'hémoglobine dont l'atome métallique serait Cr ou Mn. Fait très curieux : seul entre tous les métaux, le fer possède cette propriété (Barcroft : Conférence à la Société de Biologie, Paris 1923).

H. Fischer (63) a obtenu également avec la protoporphyrine la plupart des dérivés que l'on avait déjà préparés avec l'hématoporphyrine ; il a déterminé les caractéristiques de leur spectre d'absorption, mais sans se préoccuper de leur fluorescence.

C'était là, semble-t-il, une lacune à combler. En effet, outre l'intérêt théorique très grand de ces complexes, l'étude de leur spectre de fluorescence peut être d'un grand secours pour l'identification de la porphyrine qui entre dans leur constitution. Nous verrons que les spectres de ces dérivés métalliques présentent parfois entre eux des différences plus sensibles que ne le font les spectres des porphyrines elles-mêmes. C'est pourquoi j'ai été amené à étudier ces caractères dans plusieurs complexes obtenus avec des porphyrines extraites des coquilles d'œuf et avec de l'hématoporphyrine. Dans ce dernier but, j'ai opéré tout d'abord avec un échantillon d'hématoporphyrine de fabrication Schuchardt, puis j'ai dû, par raison de contrôle, préparer moi-même des quantités assez importantes de ce corps, en partant de l'hémoglobine du sang.

II. - Préparation de l'Hématoporphyrine

Les procédés classiques de préparation de l'hématoporphyrine sont ceux de Nencki (105) et de Willstätter (148). Ils consistent à faire agir sur l'hémine de l'acide acétique saturé de gaz bromhydrique (de densité 1,28 dans la méthode de Nencki, et 1,41 dans celle de Willstätter). Après une longue suite de précipitations par l'acétate de soude, de lavages et de redissolutions dans l'éther, on arrive, suivant la méthode employée, à l'hématoporphyrine amorphe ou cristallisée. C'est là une opération longue et délicate, dans laquelle la préparation accessoire de l'acide acétique saturé de HBr est la partie la plus laborieuse.

J'ai donc essayé, dans un but de simplification, d'obtenir de l'hématoporphyrine en partant directement du sang. La technique suivante, basée sur la propriété que possède la porphyrine de se fixer sur le carbonate de calcium, m'a donné de bons résultats.

Technique. — Dans 50 cc. d'acide chlorhydrique pur, au maximum de concentration ($d = 1,21$), on laisse tomber goutte à goutte et en agitant soigneusement, 50 gouttes de sang fluoré, lavé à trois reprises avec du sérum physiologique et ramené ensuite au volume primitif.

La solution rouge vif obtenue est neutralisée au tournesol par addition, goutte à goutte et en refroidissant constamment, de lessive de soude ($d = 1,33$) : il en faut de 55 à 60 cc. Une fois la

neutralité atteinte, on ajoute encore à la liqueur 2 cc. 5 de lessive de soude. Cette alcalinisation répond à un double but :

1° Redissoudre la porphyrine et les protéines qui avaient précipité à neutralité.

2° Se débarrasser du chlorure ferrique (provenant de la dislocation de l'hématine) à l'état d'hydrate insoluble.

La liqueur est alors filtrée à la trompe sur un tampon d'amiante qui retient $\text{Fe}^2 \text{O}^3$. On ajoute ensuite successivement au filtrat :

250 cc. d'eau distillée ;

50 cc. d'une solution de $\text{Co}^3 \text{Na}^2$ anhydre à 10 %, puis 100 cc. de chlorure de calcium à 30 %.

Il se produit un abondant précipité de carbonate de calcium qui, teinté en brun clair, entraîne toute l'hématoporphyrine ; la liqueur-mère incolore ne présente plus en effet qu'une fluorescence insignifiante. Le précipité de calcaire est recueilli sur un filtre sans plis, lavé abondamment à l'eau distillée puis séché : il présente alors en lumière de Wood, une fluorescence rouge intense. On le redissout ensuite dans la quantité minima du mélange : alcool éthylique 3 parties, HCl 1 partie (75 à 100 cc. environ).

La solution rouge obtenue est additionnée de 300 cc. d'eau distillée et de 100 cc. de pyridine pure (*) ; le mélange est enfin épuisé dans une ampoule à décantation avec 100 cc. de chloroforme qui entraîne la pyridine et la porphyrine. Ce chloroforme est décanté, desséché sur du sulfate de sodium anhydre et abandonné à l'évaporation lente : il se dépose peu à peu de l'hématoporphyrine cristallisée en lamelles prismatiques de couleur brun noir.

III. - Spectres de l'Hématoporphyrine

Les spectres d'absorption et de fluorescence obtenus avec cette hématoporphyrine se sont montrés identiques à ceux que donnait l'échantillon du même corps fabriqué par Schuchardt. En ce qui concerne la fluorescence, les chiffres coïncident parfaitement avec ceux de Dhéré et Van der Bom (33, 139) (hématoporphyrine préparée par le procédé Willstätter). Ce sont les suivants :

(Pl. I, fig. 5) Spectre acide :

Bande I	Bande II	Bande III
589 — 605 $\text{m}\mu$	613 — 624 $\text{m}\mu$	643 — 661 $\text{m}\mu$

(Pl. I, fig. 4) Spectre neutre :

Bande principale = 613 — 635 $\text{m}\mu$ (axe = 624 $\text{m}\mu$)

(*) Pour permettre à la porphyrine de passer ultérieurement dans le chloroforme, où elle est très peu soluble.

IV. - Complexes stanneux des Porphyrines

Le complexe stanneux des porphyrines se produit très facilement par chauffage d'une solution de porphyrine avec quelques gouttes d'une solution de chlorure stanneux à 35 % (*), en présence d'une quantité convenable d'acétate de sodium. Ce procédé a été appliqué successivement à l'ooporphyrine extraite de l'œuf de poule à coquille brune, puis à l'hématoporphyrine préparée par la méthode déjà décrite.

A) **Ooporphyrine.**— On dissout 1 milligramme d'ooporphyrine cristallisée dans 10 cc. d'acide acétique glacial, auquel on ajoute 111 gouttes de la solution de SnCl_2 . Le mélange est porté une minute à l'ébullition, puis additionné d'une petite quantité (1 à 2 gr.) d'acétate de sodium cristallisé. Après une nouvelle ébullition de quelques secondes, la teinte du liquide, primitivement rouge cerise, vire brusquement au rose grenat : le complexe stanneux est formé. Il est facile de l'extraire par le chloroforme, dans lequel il est très soluble ; pour cela, on ajoute à sa solution acétique trois fois son volume d'eau, puis un volume égal de chloroforme. Après quelques secousses dans une ampoule à décantation, tout le pigment est passé dans le chloroforme qui, décanté et abandonné à l'évaporation, laisse déposer le complexe stanneux sous forme de flocons brun-rouge, très solubles dans les acides et les solvants organiques.

Ces solutions présentent en lumière de Wood une fluorescence orangée très vive, bien différente comme teinte de celle de la porphyrine primitive. Le spectre de fluorescence a été déterminé avec deux solutions de complexe, l'une dans l'acide acétique, l'autre dans le chloroforme. Les deux spectres obtenus sont très voisins et apparaissent formés de deux bandes d'inégale intensité (Pl. II, fig. 2) la plus forte, située à la limite du jaune et de l'orangé, entre 571 et 593 $\text{m}\mu$ a pour axe $\lambda = 582 \text{ m}\mu$; la moins forte, s'étend dans le rouge entre : 620 et 642,5 $\text{m}\mu$. Axe = 631,5 $\text{m}\mu$.

Un complexe identique, et présentant les mêmes caractéristiques spectrales, a été obtenu avec l'ooporphyrine de mouette.

B) **Hématoporphyrine.** — Le même procédé de préparation a été appliqué à une solution d'hématoporphyrine à 1 p. 10.000 dans l'acide acétique. Le complexe se forme de la même manière et

(*) Mélanger 35 grammes de SnCl_2 crist. avec 50 cc. d'eau. Ajouter 20 cc. d'HCl pur. Chauffer au bain-marie jusqu'à dissolution. Porter à 100 cc.

passé également dans le chloroforme ; il présente les propriétés du complexe stanneux de l'ooporphyrine, sa fluorescence orangée en particulier. Le spectre de cette fluorescence apparaît formé de deux bandes d'inégale intensité (Pl. II, fig. 1) :

La plus forte de 570 à 583 $m\mu$ (axe = 576,5)

La moins forte de 620 à 631 $m\mu$ (axe = 625,5)

Si l'on compare ce spectre à celui qu'on donne le complexe stanneux de l'ooporphyrine, on observe une grande analogie de forme et de constitution. Une différence très nette réside toutefois dans la position respective des deux bandes de fluorescence : l'ensemble du spectre, dans le cas de l'hématoporphyrine est notablement décalé vers le jaune (exactement 60 $\text{\AA}$), et ce fait, nous le verrons, présente un certain intérêt.

a) *Application du complexe stanneux à l'identification des taches de sang*

L'obtention faite de ce complexe stanneux a permis une application tout à fait intéressante : la caractérisation rapide et sûre du pigment sanguin.

Un grand nombre de méthodes d'ordre physique, chimique et biologique ont été proposées pour l'identification des taches de sang. La plus connue est la transformation de l'hémoglobine en cristaux de Teichmann. Mais, quoique plusieurs auteurs, G. Bertrand entre autres, aient donné des techniques et des « tours de main » pour réussir cette réaction, elle est toujours délicate à réaliser. Aussi, s'est-on adressé à la recherche des spectres d'absorption de l'hémoglobine et de ses dérivés :

Soit l'hémochromogène (Struve, Kratter, Hammerl, Ipsen et Dvornitschenko) ;

Soit le complexe stanneux de l'hématoporphyrine (Milroy (114), Smadja (129), Portes (100).)

Ayant reconnu les avantages de ce dernier, j'ai pensé l'utiliser en recherchant, non plus son spectre d'absorption, mais les caractéristiques, beaucoup plus sensibles, de son spectre de fluorescence. L'obtention de ce complexe stanneux est très simple, elle ne nécessite aucun tour de main et peut s'appliquer à des taches de sang anciennes, datant même de plusieurs mois. La technique la plus pratique est la suivante :

On découpe, dans le papier ou l'étoffe, la tache suspecte et on

l'épuise au mortier, à trois ou quatre reprises, avec quelques gouttes d'acide acétique. Il est préférable, pour éviter une trop grande dilution, de ne pas employer au total plus de 1 cc. 5 à 2 cc. de cet acide. On ajoute à la solution acétique rassemblée dans un petit tube à essais, 11 gouttes de solution de SnCl_2 à 35 %. On porte à l'ébullition une minute : la teinte de la liqueur passe du brun clair au verdâtre, si elle renferme du sang. On ajoute alors quelques cristaux d'acétate de sodium (0 gr. 25 environ), puis on prolonge l'ébullition pendant quelques instants. La couleur de la solution passe du verdâtre au rose, s'il y a formation du complexe stanneux de la porphyrine. Ce virage indiquerait à lui seul que l'opération a réussi et permettrait de conclure à la présence de sang, mais, pour plus de sûreté, il est préférable d'examiner la fluorescence du liquide en lumière de Wood et d'enregistrer photographiquement le spectre. On observe alors les deux bandes caractéristiques, d'inégale intensité, qui ne peuvent être données que par le complexe stanneux de la porphyrine du sang.

Avec cette méthode, les risques d'erreur sont très minimes, bien moindres que si l'on se contente de l'examen d'un spectre d'absorption, plus aisément faussé. De plus, cette technique est d'une grande sensibilité ; sans doute exige-t-elle un matériel spécialisé (que l'on trouve, il est vrai, de plus en plus dans les laboratoires de médecine légale) mais elle a l'avantage d'être rapide et de laisser un document irréfutable : le cliché photographique.

b) *Mécanisme de la formation du Complexe stanneux*

La transformation de l'hémoglobine en dérivé stanneux de l'hématoporphyrine paraît, au premier abord, s'expliquer très facilement. Elle s'effectuerait en plusieurs temps :

1° L'acide acétique libère l'hématine de la molécule d'hémoglobine, ce qui explique la teinte brune de l'acide qui a dissous la tache de sang.

2° Par chauffage avec le chlorure stanneux, acidulé par l'acide chlorhydrique, l'hématine perd son fer et donne de la porphyrine. A ce moment-là, la liqueur passe du brun au rose verdâtre et devient fluorescente.

3° Lorsque l'acidité ionique du milieu a été atténuée par l'addition d'acétate de sodium, sel fortement dissocié, la porphyrine se combine au sel d'étain pour donner le complexe stanneux.

Cette explication, pour vraisemblable qu'elle soit, laisse

cependant subsister une grave anomalie. Nous avons vu qu'il fallait, dans la préparation de l'hématoporphyrine, un acide fort et très concentré pour détacher le fer de l'hématine et la transformer en cette porphyrine. Comment expliquer dès lors que le chlorure d'étain, en milieu faiblement acide, puisse transformer la protoporphyrine de l'hématine en hématoporphyrine, alors que ce même réactif agissant, dans les mêmes conditions, sur la protoporphyrine des coquilles d'œuf, donne bien le complexe stanneux de la protoporphyrine. Ce point demeuré obscur m'a incité à étudier de plus près le mécanisme de la réaction décrite plus haut. La meilleure méthode consistait à en isoler les termes successifs dès leur formation et à les identifier de façon certaine. Il m'a été ainsi possible de démontrer que la porphyrine formée par l'action du chlorure d'étain, était non pas l'hématoporphyrine, mais la protoporphyrine.

Mode opératoire. — III gouttes de sang sont mélangées en agitant à 10 cc. d'acide acétique ; on ajoute V gouttes de SnCl^2 à 35 % dans HCl 2 N et l'on fait bouillir une minute ; la coloration du liquide passe alors du brun au rouge verdâtre : c'est le stade porphyrine. On dilue la solution avec 30 cc. d'eau distillée et on l'épuise, dans une ampoule à décantation avec 10 cc. de chloroforme. La porphyrine passe dans le chloroforme : elle est donc chloroformo-soluble, comme la protoporphyrine, alors que l'hématoporphyrine ne l'est pas. De plus, cette solution donne le spectre de fluorescence de la protoporphyrine en milieu neutre : une bande principale, très forte, située entre 617,5 et 648 $\text{m}\mu$ (axe = 632,5) avec deux bandes secondaires beaucoup plus faibles d'aspect cannelé.

Si l'on enregistre d'autre part côte à côte les trois spectres de fluorescence des trois dérivés stanneux, obtenus respectivement avec l'hématoporphyrine vraie, la protoporphyrine de l'œuf de poule et la porphyrine extraite du sang par SnCl^2 , des différences très nettes apparaissent. Les positions des deux bandes sont les suivantes :

(Pl. II, fig. 1) Hématoporphyrine vraie	+ Sn axes = 576,5 et 625,5
(Pl. II, fig. 2) Protoporphyrine	+ Sn axes = 582 et 631,5
Porphyrine du sang	+ Sn axes = 582,5 et 632

On peut donc conclure, d'après ses caractéristiques spectrales, que ce dernier complexe est bien identique à celui de la protoporphyrine.

En définitive, le dérivé que Milroy et Smadja proposaient

comme le dérivé stanneux de l'hématoporphyrine pour l'identification des taches de sang, est en réalité le dérivé stanneux de la protoporphyrine. C'est le repérage excellent obtenu avec le spectre du néon, grâce aux nombreuses raies qu'il possède depuis le jaune jusqu'au rouge, qui m'a permis d'observer cette différence (*).

Le rôle du chlorure d'étain apparaît maintenant comme très clair : agissant en milieu faiblement acide sur l'hématine, il en détache le fer et libère la protoporphyrine intacte, alors qu'un acide concentré et fort, dans les mêmes conditions, aurait fixé en outre 2 H²O dans sa molécule et l'aurait transformée en hématoporphyrine (ou mésoporphyrine, dans le cas de l'acide iodhydrique, par fixation de 2 H²). Il se passe là une réaction analogue à celle que Fischer et Pützer (63) ont indiquée pour obtenir directement la protoporphyrine de l'hémoglobine : par l'action de l'acide formique sur l'hématine en présence de fer métallique très divisé. Le chlorure d'étain, réducteur puissant, jouerait le rôle catalytique du fer, tandis que l'acide chlorhydrique qui l'accompagne dans sa solution remplacerait, en qualité d'acide minéral dilué, l'acide formique, acide organique ioniquement plus faible, mais employé à son maximum de concentration.

V. - Complexes zinciques des Porphyrines

Le procédé de préparation indiqué par Milroy consiste à faire agir sur une solution de porphyrine dans l'alcool, quelques gouttes d'une liqueur zincique obtenue en ajoutant, à une solution saturée d'acétate de zinc, de l'ammoniaque, jusqu'à redissolution du précipité formé tout d'abord. Ce procédé est le seul applicable, la méthode en milieu acétique employée pour le complexe stanneux ne donnant ici aucun résultat. Le complexe zincique est ensuite séparé, après dilution de la liqueur-mère, par extraction au chloroforme. La solution obtenue possède une teinte rose saumon et présente, en lumière de Wood, une belle fluorescence orangée, dont le spectre répond, pour les deux porphyrines étudiées, aux caractères suivants :

A) **Hématoporphyrine.** — Spectres à deux bandes, d'intensité égale, situées (Pl. II, fig. 3) :

la plus forte entre 570 et 587 m μ (axe = 578,5)

la plus faible entre 620 et 636 m μ (axe = 628)

(*) La spectrographie de ces complexes stanneux confirme de plus que l'ooporphyrine est bien identique à la protoporphyrine du sang, dont la formule C³⁴ H³⁴ N⁴ O⁴ correspond à celle que Fischer a donnée pour l'hémine : C³⁴ H³² N⁴ O⁴ FeCl.

B) **Ooporphyrine.** — Spectre analogue comme aspect au précédent, mais les deux bandes sont plus décalées vers le rouge (Pl. II, fig. 4) :

Bande forte : 576 — 593 $m\mu$ (axe = 584,5)
Bande faible : 621 — 638 $m\mu$ (axe = 629,5)

VI. - Complexes des Porphyrines formés avec le Plomb

Ces complexes ont été préparés d'abord par la technique de Milroy, en ajoutant à une solution ammoniacale de porphyrine quelques gouttes d'acétate de plomb dilué. Le mélange est filtré et épuisé par le chloroforme, pour extraire le complexe formé.

On peut obtenir également ces corps par la méthode déjà utilisée pour le dérivé stanneux des porphyrines : chauffage de la solution de porphyrine dans l'acide acétique, avec quelques gouttes d'azotate de plomb à 5 %, puis avec un excès d'acétate de sodium. Le pigment est enlevé ensuite par le chloroforme, après dilution de la liqueur-mère.

Les solutions chloroformiques de complexe, préparées par l'une et l'autre méthode, possèdent une coloration rose pâle et, sous l'influence des rayons ultra-violets, une fluorescence orangée, tirant légèrement sur le rouge. Le spectre est constitué, comme les précédents, par deux bandes d'intensité inégale, dont les positions sont les suivantes :

A) **Hématoporphyrine** (Pl. II, fig. 5) :

Bande forte : 571,5 — 584,5 $m\mu$ (axe = 578 $m\mu$)
Bande faible : 615 — 626 $m\mu$ (axe = 620,5 $m\mu$)

B) **Ooporphyrine** (Pl. II, fig. 6) :

Bande forte : 572 — 595 $m\mu$ (axe = 583,5 $m\mu$)
Bande faible : 623 — 637 $m\mu$ (axe = 630 $m\mu$)

Langecker (90) attribuait (1921) au complexe formé par l'hématoporphyrine avec le plomb, une fluorescence verte, mais il semble bien qu'il s'agissait là d'une réflexion de rayons mal filtrés provenant de l'arc au mercure employé. Si l'on opère avec un écran de Wood arrêtant rigoureusement toutes les radiations visibles, la lumière de fluorescence produite ne présente aucune teinte verte, et la plaque photographique n'enregistre rien dans cette région du spectre.

VII. - Complexes des Porphyrines formés avec le Cadmium

Ces complexes ont été obtenus par le procédé de Milroy, identique à celui qui sert à préparer le dérivé stanneux. La solution acétique de porphyrine à 1 p. 10.000 est chauffée avec quelques gouttes d'une solution aqueuse de chlorure de cadmium à 15 %, puis additionnée d'acétate de soude cristallisé. La liqueur vire à l'orangé et laisse passer, après dilution, le complexe dans le chloroforme.

Cette solution chloroformique possède une fluorescence orangée, tirant sur le jaune ; le spectre apparaît encore constitué de deux bandes, dont les positions varient avec l'une et l'autre porphyrine.

A) **Hématoporphyrine** (Pl. II, fig. 7) :

Bande forte : 570 — 587 $m\mu$ (axe = 578,5)

Bande faible : 614,5 — 626,5 $m\mu$ (axe = 620,5)

B) **Ooporphyrine** (Pl. II, fig. 8) :

Bande forte : 572 — 596 $m\mu$ (axe = 584)

Bande faible : 622 — 637 $m\mu$ (axe = 629,5)

En résumé, les spectres de fluorescence donnés par les complexes de ces quatre métaux présentent les caractères suivants :

1° Certains de ces complexes se forment de préférence en milieu acétique (Sn, Cd), d'autres en milieu ammoniacal (Pb, Zn). Mais, lorsqu'on peut obtenir le dérivé métallique par les deux méthodes (Pb) il présente toujours, en solution neutre, les mêmes caractéristiques spectrales, ce qui prouve l'identité du produit.

2° Tout en conservant une intensité comparable à celle des porphyrines primitives, la fluorescence de ces complexes présente un spectre abondant surtout en radiations jaunes.

3° Dans ces complexes, la bande I du spectre de l'hématoporphyrine est toujours, par rapport à celle de l'ooporphyrine, décalée vers le jaune de 50 à 60 $\text{\AA}$.

4° C'est avec l'étain que les résultats sont les meilleurs et les plus constants. Par la facilité de son obtention et par la netteté de son spectre de fluorescence, le complexe stanneux constitue un réactif de choix pour différencier hématoporphyrine et proto-porphyrine.

VIII. - Complexes des Porphyrines avec d'autres métaux

A part les complexes des porphyrines étudiés précédemment, on en connaît quelques autres, chimiquement bien définis, mais dans lesquels toute fluorescence a été éteinte par l'apport de métal étranger : ce sont les dérivés du fer, du nickel, du cobalt et du cuivre. Je les ai préparés à nouveau, en partant d'ooporphyrine et d'hématoporphyrine, au moyen d'une solution du chlorure correspondant. Les résultats se sont montrés constants ; après l'addition d'acétate de sodium, la fluorescence de la liqueur disparaît et il passe dans le chloroforme un corps brun, plus ou moins foncé qui, dans le cas du fer, peut être considéré comme une hématine artificielle.

J'ai ensuite expérimenté, sur des solutions acétiques de ces deux mêmes porphyrines, l'action d'un certain nombre de sels métalliques, susceptibles de fournir des complexes intéressants. Dans ce but, ont été successivement utilisés : le nitrate d'argent, les chlorures d'or et de platine, le protochlorure de thorium, le sulfate de chrome, les azotates de manganèse, de lanthane et d'uranium. Dans tous les cas, l'action du sel métallique a amené une disparition complète de la fluorescence et les essais ont dû être abandonnés. Une mention spéciale doit être faite toutefois pour le cuivre et l'uranium, avec lesquels l'obtention du complexe a présenté quelques particularités.

Complexe du cuivre.— Quoique de l'avis unanime des auteurs, le complexe cuprique de l'hématoporphyrine soit dépourvu de fluorescence, Langecker (90) lui en a attribué une, de couleur violette et très intense. Il ne m'a pas été possible de reproduire ce phénomène avec l'hématoporphyrine, mais par contre l'ooporphyrine, chauffée avec une solution d'acétate de cuivre, s'est transformée à plusieurs reprises en un produit vert foncé, doué d'une belle fluorescence bleue, dont le spectre formé d'une seule bande, s'étendait depuis le vert jusqu'au début du violet. Peut-être se forme-t-il en ce cas un complexe instable et fugace, un corps en quelque sorte non saturé car, si l'on continue à chauffer quelques instants la liqueur, elle brunit rapidement et perd toute fluorescence. C'est un fait analogue qu'a dû observer Langecker avec l'hématoporphyrine.

Complexe de l'uranium. — Ce complexe présentait un intérêt tout particulier ; on pouvait en effet se demander quelles seraient les propriétés spectrales d'un corps formé par l'union d'une porphyrine et d'un sel métallique tous deux fluorescents, l'une en

rouge, l'autre en vert. Mais, pour pouvoir suivre la marche de la réaction, il fallait renoncer à opérer en milieu acétique, la plus légère acidité ionique faisant disparaître la fluorescence des sels d'uranium. J'ai donc dû étudier la formation de ce complexe en milieu neutre et en milieu alcalin.

A) **Préparation en milieu neutre.** — Une solution d'hématoporphyrine à 1 p. 10.000 dans l'alcool éthylique est additionnée d'un volume égal d'une solution d'acétate d'urane à 2 %. Après une demi-heure de chauffage au bain-marie bouillant, aucune combinaison entre les deux corps ne s'est produite ; la liqueur, examinée en lumière de Wood montre toujours les deux fluorescences rouge et verte juxtaposées.

B) **Préparation en milieu alcalin.** — La même solution d'hématoporphyrine et d'acétate d'urane est alcalinisée fortement par le quart de son volume d'ammoniaque liquide. Après un nouveau séjour de dix minutes au bain-marie bouillant, le liquide filtré ne possède plus aucune fluorescence. Le précipité d'oxyde d'uranium hydraté resté sur le filtre est dissous dans de l'acide acétique qui ne montre également aucune trace de porphyrine. Il semble donc bien que l'uranium, comme le fer, le nickel et le cobalt dont il est chimiquement le parent, donne un complexe porphyrique dépourvu de fluorescence.

IX. - Complexe zincique de l'Oocyan

A la suite de ces dérivés métalliques de l'hémato- et de l'ooporphyrine, j'ai été amené à étudier la fluorescence de quelques complexes du même genre, que fournissent, avec les sels de zinc, l'oocyan de l'œuf de mouette et la biliverdine.

Lemberg (92) a signalé, dans son étude sur l'oocyan, la propriété que possède ce corps de donner, en milieu ammoniacal, un complexe zincique doué d'une coloration verte et d'une belle fluorescence rouge en lumière ultra-violette. Le procédé de préparation que j'ai employé est le suivant :

A 5 cc. d'une solution concentrée d'oocyan dans un mélange à parties égales d'alcool-éther, on ajoute III gouttes d'une solution ammoniaco-zincique ainsi composée :

Acétate de zinc	1 gr.
Ammoniaque liquide	5 cc.

Il se forme presque aussitôt une coloration vert-pré et le liquide présente, en lumière de Wood, une fluorescence rouge intense. Ses caractéristiques spectrales sont les suivantes :

Absorption. — Une bande très intense dans le rouge, comprise entre 654,5 et 669 $m\mu$ (axe = 661,5 $m\mu$).

Toute la partie violette du spectre absorbée.

Fluorescence. — (Pl. III, fig. 1). — Une seule bande forte dans le rouge entre 643,5 et 681 $m\mu$ (axe = 662 $m\mu$), plus décalée vers l'infra-rouge que celle des porphyrines. Dans le vert apparaît également une longue bande diffuse qui paraît plutôt due aux produits d'altération de l'oocyan, car elle ne présente pas une constance absolue.

X. - Complexe zincique de la Biliverdine

Un complexe zincique analogue à celui de l'oocyan peut être préparé en partant de la biliverdine. Pour cela, on dissout 10 mgrs de bilirubine dans 10 cc. d'alcool pur, que l'on expose aux rayons ultra-violets suivant une technique qui sera exposée en détail au chapitre V de ce travail. Lorsque la formation de biliverdine est complète, la solution a pris une teinte verte très foncée ; on l'additionne alors de V gouttes du mélange ammoniac-zincique. La liqueur s'éclaircit et présente une fluorescence intense tout à fait comparable à celle que donne l'oocyan zincique. Toutefois la bande de fluorescence située dans le rouge présente de légères différences avec celles-ci (Pl. III, fig. 2) : 635 — 661 $m\mu$ (axe = 648 $m\mu$), elle est donc, par rapport à celle de l'oocyan, légèrement décalée vers l'orangé.

En résumé, il n'y a pas identité parfaite de fluorescence entre les complexes zinciques, préparés respectivement avec l'oocyan et avec la biliverdine. Ce fait, corroboré par les formules centésimales qu'a établies Lemberg, montre que l'oocyan, quoique présentant des propriétés chimiques et physiques voisines de celles de la biliverdine, ne peut lui être identifié.

Divers essais pour préparer des complexes métalliques de l'oocyan avec l'étain, le cadmium, etc., ont été tentés, mais n'ont donné aucun résultat. L'oocyan s'altère, jaunit, mais ne donne naissance à aucun corps fluorescent. Peut-être la fragilité du pigment, qui ne se conserve bien qu'en solution très acide, est-elle à incriminer. J'ai pu préparer par contre des dérivés bromés de la bilirubine, par action d'une solution alcoolique de brome à 1 p. 10.000 dans le chloroforme ; il se produit une liqueur d'un beau vert qui, en présence du réactif ammoniac-zincique, donne une fluorescence rouge, dont la faible stabilité ne m'a pas permis d'enregistrer le spectre. Un tel pigment se rapproche vraisemblablement de certains dérivés de la bilirubine, préparés récemment par Ch. Dhéré (37) et J. Roche, mais dont l'étude sortirait par trop du cadre de ce travail.

Action des rayons ultra-violets sur les Porphyrines et la Chlorophylle

L'action chimique des rayons ultra-violets est un fait d'observation courante, tant il est général. La destruction des couleurs sur les étoffes, le blanchiment des fibres textiles, la décoloration des huiles par la lumière solaire sont autant de phénomènes dus à leur influence directe. Leur action produit en ce cas les effets d'une oxydation énergique, telle qu'on l'obtiendrait artificiellement avec le chlore ou l'eau oxygénée concentrée. Elle peut également se manifester sur des produits biologiques d'origine et de propriétés très diverses :

1° **Les sucres.** — Les radiations ultra-violettes décomposent les solutions de lévulose, avec dégagement d'oxyde de carbone (H. Bierry, Henri et Ranc) (11) et celles de saccharose (Andant et Rousseau) (1). Il se produit en ce cas une véritable « fermentation ultra-violette ».

2° **Les vitamines.** — La vitamine A perd rapidement son activité sous l'influence des rayons de courte longueur d'onde (Chevallier) (20).

3° **Les venins.** — Une exposition de 70 minutes aux radiations ultra-violettes détruit, dans le venin de vipère aspic, l'échidnouvaccin et le pouvoir rabcide, mais respecte la neurotoxine et l'hémorragine (M^{me} Phisalix et F. Pasteur) (112).

4° **L'adrénaline.** — L'irradiation prolongée d'une solution concentrée d'adrénaline diminue son pouvoir hypotenseur et augmente ses effets dépresseurs, par altération chimique du principe actif (Verda J, L. Kneer et W. Burge) (142).

5° **L'Alexine,** ou pouvoir complémentaire du sérum. Ce pouvoir est rapidement affaibli, puis annihilé après une exposition suffisante du sérum aux rayons U. V. (108).

6° Les pigments. — La plupart des pigments végétaux et animaux sont plus ou moins rapidement détruits, par l'action des radiations de courte longueur d'onde. Si certains, tels que les caroténoïdes résistent longtemps, d'autres qui feront l'objet de cette étude montrent une sensibilité très grande aux rayons ultra-violet.

Ce bref exposé montre l'action chimique puissante des radiations qui s'étendent en deçà du violet, dans la partie invisible du spectre et peuvent remplir parfois un rôle non de destruction, mais d'édification. Mais il convient alors, dans ce dernier cas, de discriminer la longueur d'onde de la radiation active. Si on envisage par exemple la production de la vitamine D, on voit que l'irradiation ultra-violette du cholestérol, conduit, suivant la longueur d'onde employée, à des termes très différents. Suivant que les radiations de l'arc au mercure sont filtrées à travers :

a) le verre Uviol (qui laisse passer les longueurs d'onde comprises entre 290 et 315 $m\mu$;

b) Une solution de xylène à 1 % dans l'alcool (qui n'est opaque qu'au dessous de 275 $m\mu$) ;

c) Ou une solution alcoolique d'acide salicylique (qui ne laisse passer que les radiations supérieures à 310 $m\mu$) ;

les produits cristallisés obtenus présentent une activité physiologique très variable. La transformation s'arrête à l'un ou l'autre des termes dont la filiation complète est la suivante (Windaus, Bourdillon, Webster, etc.) : Ergostérol-Lumistérol-Tachystérol-Vitamine D²-Suprastérol (Calciférol) I et II.

A vrai dire, l'action chimique de l'U. V. sur les pigments « in vitro » est plus simple : elle se borne à une destruction par étapes. On assiste à une transformation profonde du pigment, dont il est possible de saisir au passage les termes de dégradation successifs. On retrouve alors de grandes analogies entre certains pigments qui, très différents par leur origine et leur rôle biologique, aboutissent, sous l'influence de l'irradiation ultra-violette, au même produit de transformation final.

I. - Action de la lumière solaire sur la Chlorophylle

Cette action, essentiellement complexe, varie suivant qu'on s'adresse à la chlorophylle active, répartie dans les chloroplastes de la cellule vivante ou au pigment isolé dissous dans un liquide d'extraction quelconque. « In vivo », les radiations absorbées par la chlorophylle sont indispensables à la plante pour effectuer, en

partant du CO^2 atmosphérique, l'assimilation carbonée ; le pigment lui-même ne se forme que si ces radiations, qui appartiennent à presque toutes les régions du spectre visible sont suffisamment intenses. On connaît la couleur jaunâtre des végétaux étiolés, élevés dans l'obscurité. Mais inversement, si l'on transporte à l'abri de la lumière une plante verte, elle jaunit rapidement et perd son pigment. C'est que la chlorophylle tend constamment, dans la feuille vivante, à être détruite par une diastase : la chlorophyllase, dont l'action se fait particulièrement sentir en automne, lorsque les radiations lumineuses devenues trop faibles ne permettent plus une synthèse de la chlorophylle assez active pour compenser les pertes. C'est alors la formation des feuilles automnales. Or. Richter (124) a constaté que des rameaux verts, exposés un certain temps à l'action des rayons ultra-violets ne se décoloraient plus ensuite que très lentement dans l'obscurité ; la chlorophyllase était détruite, et avec elle l'agent désorganisateur de la chlorophylle. « In vivo », le rôle de ces rayons apparaissait donc comme conservateur.

« In vitro », c'est-à-dire pour le pigment séparé du végétal vivant, les choses se passent tout autrement. On sait que la lumière altère rapidement la coloration des solutions de chlorophylle ; et cette destruction est particulièrement intense sous l'influence des radiations ultra-violettes. Mais que devient en ce cas la chlorophylle ? H. Bierry et J. Larguier des Bancels qui ont été, avec V. Henri, les premiers en France à étudier l'action chimique des rayons ultra-violets, ont constaté (12) en exposant au rayonnement de l'arc au mercure, une solution de ce pigment dans l'alcool, qu'elle se décolorait rapidement et donnait, au bout de 24 heures d'irradiation, les réactions chimiques de l'urobiline. Ce corps, que l'on ne connaissait jusqu'alors que comme un produit de désintégration des pigments biliaires devenait donc un point de contact important entre le règne animal et le règne végétal. Récemment, Richter (124) a repris cette expérience et confirmé les résultats auxquels étaient arrivés H. Bierry et Larguier des Bancels ; il a observé de plus que l'action chimique de l'ultra-violet s'étendait aux anthocyanes, qui subissent sous son influence des transformations profondes.

Cette évolution photochimique de la chlorophylle avec l'urobiline présente un tel intérêt biologique qu'elle m'a paru justifier une étude plus approfondie, à l'aide des spectres de fluorescence. Chlorophylle et urobiline ont déjà fourni, par cette méthode, à Dhéré et à ses élèves, des indications précieuses sur leur nature

chimique. Les deux bandes de fluorescence de la première (32) ont confirmé l'existence en elle de deux isomères : chlorophyllines α et β (*), très voisines par leurs autres propriétés, et l'analyse spectrographique des dérivés de l'urobiline (40) a permis d'éclairer la constitution, encore incomplètement connue, de ce pigment. Dans le but poursuivi ici, l'étude des spectres de fluorescence a permis de suivre constamment les stades de décomposition de la chlorophylle et de saisir en quelque sorte au passage, à mesure que se prolonge l'irradiation, les produits de transformation intermédiaires.

Cette méthode a été ensuite appliquée à l'irradiation de l'hématoporphyrine, de l'ooporphyrine, de l'oocyan et enfin de la bilirubine qui, sous son influence, ont tous abouti au même terme de désintégration.

II - Irradiation des solutions de Chlorophylle

a) *Préparation de la solution*

La chlorophylle brute, obtenue par épuisement des feuilles vertes au moyen de l'alcool ou de l'acétone, renferme, à côté des chlorophyllines α et β , les xanthophylles et le carotène dont il importe de se débarrasser. On peut utiliser à cette fin les solubilités différentes de ces divers corps dans l'alcool dilué et l'éther de pétrole, mais il est préférable d'employer la technique de Tswett (137), basée sur leur adsorption inégale par une colonne de carbonate de calcium (méthode déjà mise à profit, dans d'autres buts, par plusieurs auteurs : Vegezzi (140), etc.).

Technique. — On prend 50 grammes de feuilles d'épinard, qui sont hachées finement, puis mises à macérer dans le mélange suivant :

Alcool à 95°	200 cc.
Ether de pétrole pur	50 cc.

La chlorophylle brute passe peu à peu dans le solvant, mais, par suite de l'apport d'eau des feuilles, l'alcool baisse de titre et se sépare de l'éther de pétrole qui se rassemble à la partie supérieure du liquide. Au bout de 24 heures de contact, on décante cet éther et on le lave à trois reprises avec de l'eau distillée, dans une ampoule à décantation, pour éliminer soigneusement l'alcool. On le déshydrate ensuite sur du sulfate de sodium desséché : la liqueur verte

(*) Certains auteurs emploient le terme « chlorophylline α ou β pour les distinguer de la chlorophylle, mot qui désigne le pigment brut, mélange des deux isomères.

obtenue est alors prête pour l'adsorption sur le filtre de CO^3Ca .

Ce filtre, pour être efficace, devra répondre aux conditions suivantes :

1° Le carbonate de calcium doit être parfaitement sec. Il faut, avant l'opération, le dessécher 12 heures à l'étuve à 100° .

2° Il doit être convenablement et régulièrement tassé dans le tube de verre ; sinon, le chromatogramme obtenu présenterait des vides et des boursoufflures.

3° Le tube rempli de CO^3Ca doit être suffisamment long pour pouvoir retenir les pigments qui ne posséderaient qu'une faible affinité pour le calcaire. Une longueur de 20 cm est nécessaire pour pouvoir séparer les constituants de la chlorophylle brute. Il faut enfin choisir ce tube suffisamment large si l'on veut recueillir une certaine quantité de chacun des pigments sélectionnés.

Le filtre est monté sur une fiole à tubulure latérale reliée à une trompe à vide. On verse alors l'éther de pétrole dans la partie supérieure du tube, évasée en entonnoir, et l'on fait un vide d'abord modéré, puis un peu plus poussé, de manière à avoir un écoulement régulier et assez lent du liquide. Les pigments commencent presque aussitôt à se séparer sous forme d'anneaux colorés qui s'étagent dans le tube. Puis, à mesure que se prolonge l'opération, ces anneaux se déplacent, voyagent « wandern » suivant l'expression de Tswett, le long de la colonne calcaire, pour venir prendre leur place définitive. On arrête l'extraction lorsque le pouvoir adsorbant du calcaire arrive à son terme ; à ce moment-là, le liquide qui s'écoule goutte à goutte dans la fiole à vide, prend une teinte verdâtre, due à la chlorophylle qui n'est plus retenue. Le tube présente alors, de haut en bas, la succession des anneaux suivants :

vert foncé	= chlorophylline α
vert pâle	= chlorophylline β
jaune vif	= xanthophylle α
jaune pâle	= xanthophylle β

Le carotène, qui n'est pas fixé par le carbonate de calcium, a été entraîné dans la fiole par l'éther de pétrole.

On laisse sécher quelques heures le tube de verre, puis on enlève séparément la couche pulvérulente correspondant à chaque pigment. Le carbonate de calcium obtenu est traité par de l'alcool à 95° qui reprend complètement le pigment adsorbé. J'ai ainsi réuni les chlorophyllines α et β ; la solution alcoolique, diluée avec trois fois son volume d'eau distillée, est épuisée par le chloroforme pur, qui reprend les deux pigments.

b) *Irradiation de la solution*

Cette solution chloroformique de chlorophylle est prête pour l'irradiation : elle est placée dans un gros tube cylindrique en quartz transparent, dans lequel plonge un deuxième tube, parcouru par une circulation rapide d'eau froide. Avec ce dispositif, la température de la solution de chlorophylle ne s'élève jamais à plus de 40°, même après une exposition de plusieurs heures au rayonnement de l'arc au mercure. Il n'y a donc pas à craindre l'évaporation du chloroforme, ni surtout l'altération par la chaleur des pigments étudiés. Le tube de quartz est placé finalement devant les radiations de l'arc, filtrées au moyen d'un écran ne laissant passer que l'ultra-violet et l'extrême-violet en deçà de 400 m μ . La décoloration de la solution de chlorophylle se produit alors graduellement ; de vert foncé au début, elle devient :

brun verdâtre	après 1 heure d'irradiation
brun clair	— 5 — —
jaune d'or	— 8 — — —
jaune pâle	— 11 — — —

A ce moment-là, un stade définitif paraît être atteint, car une irradiation beaucoup plus longue (jusqu'à 18 heures) n'amène plus aucun changement dans la coloration de la solution.

c) *Variations des spectres de fluorescence*

J'ai déterminé le spectre de fluorescence de la solution chlorophyllienne à différents stades de son irradiation. Examinée en lumière de Wood, elle montre au début une fluorescence rouge sombre avec le spectre typique des chlorophyllines α et β : (Pl. III, fig. 3) :

Bande I :	693 — 676 m μ (axe = 685 m μ)
Bande II :	660 — 650 m μ (axe = 655 m μ)

De plus, la bande I, correspondant à la chlorophylline β est moins intense que l'autre.

Après quelques heures d'irradiation, commence à apparaître dans le vert une large bande, d'abord estompée, puis très intense, qui arrive à occuper toute la région jaune et verte du spectre. Sa position est alors la suivante (Pl. III, fig. 4) :

605 — 455 m μ (axe = 530 m μ).

En même temps, les deux bandes rouges du début se sont

atténuées peu à peu et ont fini, après la 9^e heure d'irradiation, par disparaître complètement.

La chlorophylle a donc bien été détruite par les rayons ultraviolets et transformée en une autre substance à fluorescence verte, sur laquelle nous aurons à revenir plus loin.

III. - Irradiation de l'Hématoporphyrine

Dans les mêmes conditions, a été irradiée une solution à 1 p. 10.000 d'hématoporphyrine pure dans un mélange à parties égales de chloroforme et de pyridine. La solubilité très faible de ce pigment dans le chloroforme pur, rendait obligatoire l'adjonction de pyridine, dans laquelle il est beaucoup plus soluble.

Cette solution a été placée dans le tube de quartz, refroidi intérieurement, et exposée aux radiations de l'arc au mercure. On observe alors un phénomène analogue à celui que nous avons pu constater dans l'irradiation de la chlorophylle : il est seulement beaucoup plus rapide. En effet, au bout d'une demi-heure, la coloration rouge brun de l'hématoporphyrine commence déjà à s'atténuer et vire peu à peu au brun clair. Cette teinte brune pâlit à son tour et après trois heures d'exposition aux rayons ultraviolets, la solution parvient à une coloration jaune pâle, qui constitue le terme de ses transformations photochimiques.

Pendant tout ce temps, le spectre de fluorescence de la solution irradiée n'a cessé de se modifier. La bande principale de l'hématoporphyrine (axe = $624\text{ m}\mu$) a peu à peu disparu pour faire place à une large bande, localisée dans le vert et le jaune, dont la position : $458 - 599\text{ m}\mu$ (axe = $529\text{ m}\mu$), est presque identique à celle qu'a déjà donné le produit d'irradiation de la chlorophylle.

IV. - Irradiation de l'Ooporphyrine

Cette fragilité des porphyrines, exposées aux rayons ultraviolets, avait été déjà signalée. Dhéré et ses élèves recommandent en effet, lorsqu'on enregistre le spectre de fluorescence de l'hématoporphyrine, de changer fréquemment la solution de pigment, qui s'altère très vite sous l'influence de l'irradiation. En ce qui concerne la porphyrine de l'œuf, le même auteur indique que des coquilles d'œuf de poule, abandonnées dans la pyridine, laissent souvent passer dans ce solvant des traces d'une substance douée d'une fluorescence verte. C'est, d'autre part, un fait connu que les œufs

exposés à la lumière (dans les collections zoologiques par exemple) perdent rapidement leur fluorescence, et la conservent beaucoup plus longtemps, si on les garde à l'obscurité. Ces quelques faits semblaient justifier une expérimentation plus complète.

A) J'ai tout d'abord abandonné en plein soleil plusieurs œufs de poule fraîchement pondus, et dont la coquille présentait, en lumière de Wood une fluorescence très forte. Au bout de 24 heures d'insolation discontinue, l'intensité de cette fluorescence avait déjà considérablement baissé ; après 60 heures, il n'en subsistait plus qu'une lueur verdâtre assez faible.

B) A l'action, forcément complexe des rayons solaires, il était préférable de substituer celle des radiations ultra-violettes de l'arc au mercure. C'est pourquoi j'ai été amené, pour en étudier la stabilité, à irradier une solution d'ooporphyrine dans le chloroforme.

Cette solution à 1 p. 10.000 d'une porphyrine extraite de la coquille d'œufs de poule très bruns, a été placée dans le tube de quartz refroidi, puis irradiée. La décoloration s'est produite plus lentement qu'elle ne l'avait fait pour l'hématoporphyrine ; il a fallu une irradiation de 6 heures pour amener la solution jusqu'à la teinte jaune pâle. Une particularité intéressante et spéciale à l'ooporphyrine a marqué cette opération. Pendant la première demi-heure d'exposition aux rayons U. V., la solution irradiée, au lieu de brunir, a viré franchement au vert, tout en conservant une fluorescence rouge très vive. Deux heures après seulement, la coloration verte de cette solution a commencé à s'éclaircir en tournant peu à peu au jaune. Il semble s'être produit là un fait analogue à celui que l'on peut observer en dissolvant l'ooporphyrine dans de l'alcool additionné d'acide azotique : ce pigment vert, peut-être identique aux chlorines et verdines de H. Fischer, paraît être un produit d'oxydation transitoire de la porphyrine.

Au point de vue spectrographique, des anomalies en rapport avec ce phénomène, se sont produites. De la bande primitive de l'ooporphyrine (Pl. I, fig. 2) :

617,5 — 649 $m\mu$ (axe = 633 $m\mu$)

on arrive, lorsque la solution irradiée est devenue franchement verte, à un spectre formé de deux bandes, dont la première est moins décalée vers l'infra-rouge, et qui présentent les positions respectives suivantes (Pl. III, fig. 5) :

Bande I : 623 — 633 $m\mu$ (axe = 628 $m\mu$)

Bande II 653 — 675 $m\mu$ (axe = 664 $m\mu$)

Ces bandes perdent de leur intensité à mesure que se prolonge l'irradiation et finissent par disparaître tandis que se forme une bande de fluorescence verte que sa position :

464 — 594 $m\mu$ (axe = 529 $m\mu$)

nous montre identique à celle qu'ont données chlorophylle et hématoporphyrine.

V. - Irradiation de l'Oocyan

L'oocyan se montre très sensible aux radiations ultra-violettes ; à l'état dissous, il perd très rapidement sa coloration, après une demi-heure au maximum d'irradiation. Fixé sur du calcaire, tel qu'il se présente dans la coquille de l'œuf de mouette, il est par contre beaucoup plus résistant.

Une solution très concentrée d'oocyan dans l'alcool éthylique est placée dans le tube de quartz refroidi intérieurement et exposée aux rayons U. V. Presque dès le début de l'irradiation, la teinte vert foncé de la solution vire au bleu-noir, puis la décoloration commence ; elle est complète en 40 minutes. Il ne subsiste plus alors qu'une teinte jaunâtre accompagnée d'une fluorescence verte peu intense. Avec un temps de pose suffisamment prolongé, il m'a été possible d'enregistrer le spectre qui apparaît, ici encore, constitué d'une seule bande d'axe $\lambda = 532 m\mu$ (bords extrêmes : 471 et 593 $m\mu$).

VI. - Irradiation de la Bilirubine

Si la bilirubine est un corps très stable à l'état solide, ses solutions sont par contre très fragiles à la lumière. Elles résistent mal en particulier — H. Bierry et J. Larguier des Bancels (9) l'avaient déjà remarqué — aux radiations ultra-violettes. Que devient la bilirubine ainsi irradiée ? J'ai voulu voir s'il n'y aurait pas analogie de transformation avec l'oocyan qui présente, on le sait, des propriétés très voisines de celles de la biliverdine.

20 milligrammes de bilirubine pure sont dissous dans 10 cc. de chloroforme. Cette solution est filtrée, puis versée dans le tube de quartz refroidi. Au cours de l'irradiation, les variations de couleur suivantes sont notées :

Après 15 minutes : la solution jaune d'or commence à verdir.

Après 30 minutes : elle est devenue vert foncé.

Après 1 heure : elle commence à s'éclaircir.

Après 2 heures : elle ne présente plus qu'une teinte verdâtre assez faible.

Après 2 heures 30 : elle est devenue jaune verdâtre.

Premier fait à remarquer : par exposition aux rayons ultra-violets, la bilirubine commence par se transformer en biliverdine, alors qu'en lumière du jour, elle se décolore lentement sans passer par ce stade intermédiaire.

En deuxième lieu, cette biliverdine se détruit pour donner finalement un corps faiblement coloré et doué d'une fluorescence que ses caractéristiques spectrales : une bande verte située entre 472 et 584 $m\mu$ (axe = 528 $m\mu$) rapprochent beaucoup des produits d'irradiation déjà étudiés.

VII. - Irradiation d'un Complexe stanneux des Porphyrines

Il semble bien que l'addition d'un atome métallique à la molécule de porphyrine, augmente considérablement sa résistance à la lumière solaire et aux radiations ultra-violettes. En effet, si l'hémoglobine et les porphyrines sont, à ce point de vue, très fragiles, l'hématine est la forme stable des pigments sanguins : c'est elle qui constitue les taches de sang, résistant à la lumière, pendant des années, sur des étoffes où on peut les identifier par réaction chimique ou spectrale.

On observe un phénomène analogue avec le complexe stanneux de l'hémato- ou de l'ooporphyrine. Dissous dans le chloroforme, j'ai pu constater qu'il résistait de façon exceptionnelle à l'ultra-violet solaire ou artificiel. Après 15 heures d'irradiation, la couleur rose de cette solution avait à peine bruni et sa fluorescence était demeurée tout aussi intense. Placée dans un tube de quartz hermétiquement clos, elle a même résisté à un mois complet d'exposition au plein soleil de l'été ; cette expérience montre à quel point l'adjonction d'un atome d'étain renforce la solidité à la lumière, normalement assez faible, de ces deux porphyrines. Il se produit là un phénomène physique vraiment curieux dont il serait intéressant d'approfondir le mécanisme.

Conclusions

Le terme d'aboutissement auquel on arrive, en irradiant chlorophylle, porphyrines et pigments biliaires est donc toujours, après un temps plus ou moins long, le même corps, caractérisé par sa fluorescence verte, dont le spectre est formé d'une large bande d'axe $\lambda = 530 \text{ m}\mu$. L'expérience montre que ce corps possède les propriétés physiques et chimiques de l'urobiline.

Une solution-type de ce corps a été préparée au moyen d'un échantillon d'urobiline naturelle fourni par la firme Schuchardt. Cette solution chloroformique à 1 p. 10.000 montrait, en lumière de Wood, une belle fluorescence verte, rendue un peu plus intense par addition d'une trace d'acétate de zinc ; le spectre apparaissait constitué par une bande très forte, s'étendant depuis l'orangé jusqu'au bleu autour d'un axe extrêmement voisin de $\lambda = 530 \text{ m}\mu$. La même solution présentait également un spectre d'absorption très caractéristique :

- I. une bande forte d'axe $620 \text{ m}\mu$
- II. une large bande située entre 520 et $470 \text{ m}\mu$
- III. toute la région violette du spectre absorbée.

Chacun des produits obtenus par irradiation a donné, en même temps que la solution-type d'urobiline, l'aldéhyde-réaction d'Ehrlich. Cette réaction se produit en ajoutant, à une solution alcoolique du pigment examiné, après réduction à l'état d'urobilinogène incolore, au moyen de l'hydrate ferreux (méthode Terwen), quelques gouttes de la solution suivante :

Diméthylamino-parabenzaldéhyde	1 gr.
HCl pur	25 gr.
Eau distillée	25 gr.

Si la réaction est positive, il se forme rapidement une coloration rouge plus ou moins intense, caractéristique de l'urobiline, de la bilirubine et de quelques-uns de leurs produits de transformation.

Filiation de l'Urobiline

L'urobiline ou plutôt les urobilines car, nous le verrons, l'unité de ce corps n'est pas démontrée, représentent avec l'hématine, les porphyrines et la bilirubine, une véritable filiation de pigments qui revêt dans le règne animal une importance considérable. Les rapports qui unissent ces divers corps sont maintenant bien connus, grâce à de nombreux travaux, pour la plupart récents,

qui ont éclairé, à un double point de vue chimique et biologique, le problème de l'urobiline (H. Fischer).

A) Au point de vue chimique, tous ces pigments sont formés d'un noyau tétrapyrrolique sur lequel viennent se souder des chaînes latérales variées. « In vitro », les liens qui les unissent sont les suivants :

1° L'hématine ($C^{34} H^{32} N^4 O^1 Fe$) qui, soudée à la globine, constitue le pigment sanguin, est elle-même le complexe ferreux de la protoporphyrine. Elle peut, nous l'avons vu, perdre son fer sous l'influence des acides forts et libérer la porphyrine.

2° De cette porphyrine en C^{34} , on passe en deux temps à la bilirubine, qui possède un atome de carbone de moins :

a) La porphyrine, par hydratation de ses doubles liaisons donne un acide-alcool, susceptible de perdre CO^2 .

b) Le corps ainsi obtenu voit, par oxydation, deux de ses groupements pyrroliques transformés en oxypyrroles et H^2 éliminé à l'état d' H^2O .

3° La bilirubine ($C^{33} H^{36} N^4 O^6$), réduite par l'hydrogène, en présence de palladium colloïdal, fixe 2 H^2 et donne un pigment jaune : la mésobilirubine ($C^{33} H^{40} N^4 O^6$). Mais, réduite plus profondément encore, par l'amalgame de sodium par exemple, elle donne un corps incolore : le mésobilirubinogène ($C^{33} H^{44} N^4 O^6$), tout à fait identique à un produit de réduction de l'urobiline naturelle, incolore également et qui est l'urobilinogène. Ce dernier, tout comme le mésobilirubinogène, s'oxyde rapidement à l'air pour donner l'urobiline, pigment brun isomère de l'héxahydrohémato-porphyrine, encore mal défini chimiquement, mais caractérisé par la belle fluorescence verte qu'il possède, surtout en présence de sels de zinc.

De tous ces stades de transformation, le plus difficile à effectuer pour la synthèse chimique est le second (81) : passage de la porphyrine à la bilirubine. Il n'a été réalisé jusqu'à présent que de façon incomplète, mais il n'est pas douteux que des méthodes plus perfectionnées permettront un jour la synthèse intégrale de la bilirubine.

B) Si l'on envisage la question du point de vue biologique, il ne semble pas que, « in vivo », la filiation hématine-porphyrine-bilirubine soit aussi laborieuse. L'hématoïdine de Virchow, que l'on trouve dans les vieux extravasats sanguins possède des propriétés qui la rapprochent aussi bien de la bilirubine que de

l'hématoporphyrine ; or, c'est un produit d'altération de l'hématine. Quant à l'urobiline, les auteurs ne sont pas d'accord sur le lieu de sa formation dans l'organisme : Hayem la croit d'origine hépatique. Pour d'autres, le foie n'aurait qu'un rôle secondaire : il se contenterait de résorber ou de laisser passer dans l'urine, une urobiline normalement formée, soit dans l'intestin, soit, d'après Gilbert et Herscher (70), dans le rein. En tout cas, s'il est certain que l'urobiline provient, tout comme la bilirubine, d'une transformation des pigments sanguins, il est bien probable que sa production dépend étroitement de la cellule hépatique (*). N'existant dans l'urine normale qu'à l'état de traces ou plus souvent de chromogène incolore, l'urobiline voit sa proportion augmenter considérablement dans les affections du foie et les intoxications lésant cet organe. Il semble donc bien que cette urobiline soit, dans l'organisme animal, le terme ultime de désintégration des pigments sanguins et biliaires.

Nous avons vu que l'irradiation de la chlorophylle, des porphyrines et des pigments biliaires conduisait à des corps présentant toutes les propriétés physiques et chimiques de l'urobiline naturelle. Y a-t-il identité absolue entre ces divers produits ? On ne saurait à priori l'affirmer. Si l'on se rapporte aux auteurs qui ont étudié la question, tous sont d'accord sur la pluralité des urobilines :

« Peut-être ce que les biochimistes appellent « Urobiline » n'est-il pas une substance unique, mais un mélange ; peut-être s'agit-il d'un produit de condensation assez instable et incristallisable ? » (Javillier) (81).

Ch. Dhéré et J. Roche (40) sont encore plus affirmatifs ; pour eux, il n'existe qu'« une » urobiline, celle qui dérive du mésobilirubinogène. Quant aux autres, qu'elles soient artificielles ou naturelles, normales ou pathologiques, elles peuvent être des corps chimiquement différents, pas tous forcément tétrapyrroliques, mais possédant cependant une propriété commune : la fluorescence verte en présence des sels de zinc. Quoi qu'il en soit, il est remarquable que, sous l'influence des radiations ultra-violettes, ce type de corps soit le terme final de dégradation des deux grands pigments du règne animal et du règne végétal, de même que l'étioporphyrine semble être, d'après H. Fischer, le point de départ commun pour leur édification.

(*) On a pu observer, *in vitro*, la production d'urobiline par le tissu hépatique (P. Royer) (126).

Les Fluorescences des parties internes de l'œuf

I - Les pigments du Vitellus

Le pigment essentiel du jaune d'œuf a été étudié tout d'abord par Willstätter et Escher (147) qui étaient parvenus, en partant de 3.000 œufs de poule et après une extraction très laborieuse, à en obtenir quelques centigrammes. Ce pigment, très soluble dans les corps gras dont il est difficile de le séparer, cristallise à l'état de pureté, en lamelles rouge brun très altérables. Willstätter et Escher l'ont appelé « lutéine » et en ont établi la formule centésimale $C^{40} H^{56} O^2$ qui l'apparente au carotène et en fait un isomère de la xanthophylle végétale.

Récemment (1921), Kühn et Smakula (88), reprenant l'étude de la lutéine ont démontré qu'elle n'était pas un corps chimiquement défini, mais un mélange en proportions variables de xanthophylle et de zéaxanthine, deux caroténoïdes isomères de formule $C^{40} H^{56} O^2$, qu'ils sont parvenus à séparer par adsorption fractionnée sur du carbonate de calcium. Le pigment du jaune d'œuf de poule renfermerait environ 30 % de zéaxanthine et 70 % de xanthophylle.

Ce pigment peut se trouver du reste en proportions extrêmement variables dans le jaune. La coloration de ce dernier peut aller du blanc presque pur au rouge orangé intense et ces variations, contrairement à celles des pigments de la coquille, paraissent dépendre en grande partie de l'alimentation de l'animal. Une nourriture riche en plantes vertes provoque une pigmentation jaune vif du vitellus, qui tourne au rouge sombre si on ajoute de la viande. Peut-être l'oiseau trouverait-il toute formée dans la chlorophylle brute des feuilles, la xanthophylle qui concourt à la coloration du jaune de l'œuf ? (*). En tout cas, si c'est là une source

(*) Euler et Hellström voient une certaine parenté chimique entre la chlorophylle et la xanthophylle ; il y aurait passage de la première à la seconde par élimination de l'azote et du magnésium, puis par ouverture de la chaîne tétrapyrrolique dont la xanthophylle conserverait les doubles liaisons.

possible de lutéine, ce n'est certainement pas la seule ; comment expliquer en effet que certains oiseaux marins qui ne se nourrissent que de poissons pondent des œufs dont le vitellus, est si fortement coloré (goéland) ?

Une étude des pigments fluorescents de l'œuf serait enfin incomplète si elle ne mentionnait la présence, signalée par Königsdorfer (loc. cit.) d'une porphyrine dans le vitellus de l'œuf ; mais cette importante question sera reprise en détail à la fin de ce chapitre.

a) *La Fluorescence du jaune d'œuf*

Il ne semble pas que la fluorescence des caroténoïdes ait été jusqu'à présent bien étudiée. La plupart des auteurs la considèrent comme banale et ne la tiennent que pour une cause d'erreur qu'il convient d'éviter dans l'examen des autres fluorescences. Dans toute cette famille de pigments apparentés au carotène et si bien connus grâce aux recherches de l'école de Karrer, deux seulement sont cités pour leur fluorescence et encore y a-t-il désaccord à leur sujet.

Tswett (136) n'attribue cette propriété ni au carotène, ni à la xanthophylle. H. Escher (50) prétend par contre qu'en solution dans l'alcool absolu, la xanthophylle présente une fluorescence rouge. C'est là vraisemblablement une erreur et Ch. Dhéré (38) a pu constater que si les solutions de carotène possèdent une fluorescence verte, celles de xanthophylle pure en sont certainement dépourvues. Enfin, d'après G. Klein et Linsér (84), le liquide d'extraction des feuilles vertes par l'alcool, présenterait après enlèvement de la chlorophylle au moyen de l'éther de pétrole, une fluorescence verdâtre, due au carotène et à la xanthophylle.

Il n'est pas douteux cependant qu'une meilleure connaissance de ce phénomène, rendrait, au point de vue des caroténoïdes, de grands services ; elle faciliterait peut-être, comme pour les porphyrines, l'identification de certains pigments, très voisins chimiquement et dont l'analyse élémentaire reste le seul moyen pratique de caractérisation.

Ayant eu à examiner, en lumière de Wood, des coquilles d'œuf accidentellement tachées de jaune, j'ai vu ces taches émettre une fluorescence jaune verdâtre intense. L'expérience, répétée avec des œufs d'origines diverses, a donné les mêmes résultats, quoique déjà à première vue, il semblait que la teinte de la fluorescence

variait légèrement d'une espèce à l'autre. Une étude spectrale minutieuse devait permettre d'étudier la question de plus près.

Un premier essai a été traité avec le produit d'extraction du jaune par l'acétone pure. La solution obtenue, excitée par des radiations exclusivement ultra-violettes, a donné un spectre, dont les caractéristiques se sont montrées légèrement différentes, suivant qu'on s'est adressé à l'œuf de poule ou à l'œuf de goéland.

A) Avec l'œuf de poule, on observe une large bande de fluorescence comprenant tout le jaune et une partie du vert, située entre 498 et 609 $m\mu$ (axe = λ 553 $m\mu$) (Pl. III, fig. 6). Cette bande diffère de celle de l'urobiline par les caractères suivants :

1° Elle ne s'étend que jusqu'à la moitié environ du vert (axe = 553 $m\mu$), tandis que celle de l'urobiline comprend toute la partie verte du spectre (axe = 529 $m\mu$).

2° La partie de la bande comprise dans le jaune est plus intense que la partie verte, alors qu'on remarque l'inverse dans le cas de l'urobiline. D'ailleurs, la lumière de fluorescence elle-même de la lutéine est beaucoup plus jaune ; il ne semble donc pas que l'on puisse confondre ces deux fluorescences, assez voisines au premier abord.

B) Le jaune de l'œuf de goéland présente toujours une coloration rouge orangé très vive. Sa solution acétonique montre, en lumière de Wood, une fluorescence jaune d'or, dont le spectre apparaît constitué de deux bandes (Pl. III, fig. 7) :

1° L'une, localisée dans le vert et le jaune, que sa position (axe = λ 554 $m\mu$) permet d'assimiler à celle que donne la lutéine de l'œuf de poule.

2° L'autre très étroite et située dans l'orangé, à la limite du rouge, entre 627 et 635 $m\mu$ (axe = λ 631 $m\mu$).

Cette deuxième bande paraît bien spécifique de l'œuf de goéland, car aucun autre œuf ne l'a donnée, quelle que soit la longueur du temps de pose. Est-elle due à une modification dans la composition du pigment, ou bien à la présence d'un autre corps fluorescent ? Le problème paraissait difficile à résoudre ; il sera résolu plus loin à propos de la porphyrine du vitellus.

b) *Essai d'isolement de la Lutéine de l'œuf*

Il semble que la fluorescence observée est bien due à la lutéine, plutôt qu'à tout autre constituant chimique du jaune de l'œuf.

En effet, outre qu'au premier abord, l'intensité de cette fluorescence paraît proportionnelle à la pigmentation du jaune, une telle propriété ne peut être attribuée ni aux phosphatides, ni à la cholestérine, ni aux graisses qui rentrent dans la composition de cette partie de l'œuf.

Cependant, dans un but de contrôle, j'ai été amené à étudier successivement :

1° La fluorescence de la lutéine, séparée aussi bien que possible des corps étrangers qui l'accompagnent dans le jaune.

2° La fluorescence d'un pigment, très voisin chimiquement, et extrait des graines de maïs.

En ce qui concerne la première opération, l'essentiel était d'éliminer de l'acétone d'extraction la petite quantité de matières grasses qui retient énergiquement le pigment. Abandonnant la technique de Willstätter et Escher, j'ai préféré recourir à la saponification (*), qui, tout en solubilisant dans l'eau les lipoides, ne paraît pas altérer beaucoup la lutéine.

Technique. — Deux jaunes d'œuf de poule, choisis aussi colorés que possible, sont agités vivement avec 50 cc. d'acétone pure, puis laissés au repos toute une nuit. Le liquide filtré est évaporé dans le vide à siccité. Le résidu repris par l'alcool (15 cc.) est additionné de 3 cc. de lessive de soude ; le mélange est placé dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux et chauffé pendant dix heures au bain-marie bouillant. Au bout de ce temps, la liqueur alcoolique saponifiée est étendue avec 50 cc. d'eau distillée et épuisée à deux reprises avec 10 cc. d'éther. Le pigment passe dans l'éther, qui présente alors, en lumière de Wood, une fluorescence jaune verdâtre intense, tout à fait identique par son spectre à celle que donnait le liquide primitif d'extraction par l'acétone.

La même méthode a été appliquée au vitellus provenant d'œufs de différents animaux : oie, dinde, cane, tortue, etc. Chaque fois, le pigment jaune passait dans les solvants organiques en leur communiquant une fluorescence jaune plus ou moins verdâtre.

(*) Procédé analogue à celui qui est employé pour concentrer les extraits alcooliques de vitamine A ; après saponification par la potasse et élimination des savons par l'eau, la vitamine se trouve dans l'insaponifiable (cholestérine) (68).

c) Analogies de la Lutéine et des Pigments du maïs

Le pigment jaune du grain de maïs (*Zea maïs*) est constitué par un mélange de deux caroténoïdes isomères : xanthophylle et zéaxanthine ; il se rapproche donc beaucoup, aux proportions près des constituants, de celui du jaune d'œuf. Il est très facile à extraire, par macération de la farine de maïs (polenta) dans l'acétone ou le chloroforme (*). Au bout de quelques jours, le liquide a pris une belle teinte jaune et la farine apparaît presque complètement décolorée. La solution de pigment montre, en lumière de Wood, une fluorescence verdâtre assez intense, dont le spectre est extrêmement voisin de celui que nous a donné la lutéine de l'œuf de poule. On observe une large bande, d'axe $\lambda = 558 \text{ m}\mu$, qui comprend tout le jaune et une partie du vert.

L'analogie de ces deux fluorescences montre en définitive qu'elles peuvent être attribuées, pour le jaune d'œuf comme pour le grain de maïs, au mélange de xanthophylle et de zéaxanthine qui en constitue le pigment.

d) La Porphyrine du Vitellus

Certaines spectrographies de fluorescence obtenues avec l'extract acétonique du jaune d'œuf de goéland présentaient, nous l'avons vu, une bande étroite dans le rouge dont l'axe coïncidait presque exactement avec celui de la bande principale de la protoporphyrine. Grâce à un spectroscope de fluorescence très perfectionné (construit par M. Ch. Dhéré), il m'a été possible d'observer les faits suivants :

Le jaune d'œuf de poule examiné directement avec ce spectroscope (radiations excitatrices inférieures à $\lambda = 400 \text{ m}\mu$) montre, outre une bande intense dans les régions verte et jaune du spectre, une bande très nette dans le rouge, à peine décalée vers l'infra-rouge par rapport à celle que donne une solution alcoolique de protoporphyrine. Il est donc logique de conclure en ce cas à la présence de cette même porphyrine.

Le jaune d'œuf de cane renferme également de la protoporphyrine, mais elle n'est pas apparente à l'examen direct ; il faut, pour la mettre en évidence, recourir à une élimination complète

(*) Douglas M. Gay et M. Mac Iver, recherchant les causes de la pellagre humaine, ont extrait par l'alcool le pigment du maïs et déjà observé la fluorescence de la solution obtenue.

de la lutéine. Dans ce but, le vitellus est épuisé à plusieurs reprises par l'acétone (solvant qui s'est montré le plus favorable à cette opération) jusqu'à obtention d'un coagulum floconneux et complètement décoloré. Ce résidu possède alors une fluorescence blanche dont la lumière occupe toute l'étendue du spectre visible, mais il se superpose de plus une bande très forte dans le rouge, dont la position coïncide exactement avec celle de la protoporphyrine. D'autre part, le liquide d'extraction provenant d'épuisements répétés, perd peu à peu sa fluorescence verte, tandis que la bande caractéristique de la protoporphyrine y apparaît avec une intensité croissante.

En un mot, le spectre de fluorescence de la porphyrine devient de plus en plus visible dans le résidu d'extraction du vitellus à mesure que la lutéine est mieux éliminée par les traitements successifs à l'acétone. Ce pigment voile donc la fluorescence produite par la porphyrine, soit que cette dernière se trouve (œuf de cane) dans l'émulsion vitelline sous une forme colloïdale non fluorescente, modifiée par l'action de l'acétone, soit que les deux groupes de radiations secondaires vertes et rouges, émises sur des longueurs d'onde différentes, se contrarient mutuellement.

Il est regrettable que la saison trop avancée ne m'ait pas permis d'examiner, dans les mêmes conditions, du jaune d'œuf de goéland, qui doit être singulièrement riche en porphyrine, puisqu'il est le seul qui ait donné, sur le cliché photographique, la bande de fluorescence caractéristique de ce pigment. Quoi qu'il en soit, la présence de protoporphyrine dans le vitellus de l'œuf, offre un intérêt réel : elle s'y trouve sans doute en relation étroite avec l'hématogène et l'hémoglobine qui apparaît, on le sait, dans l'embryon, presque dès le début de l'incubation.

II - La Fluorescence de l'Albumine de l'œuf

Les phénomènes de fluorescence ne se bornent pas, dans l'œuf des oiseaux, à la coquille et au vitellus ; ils s'étendent encore à la membrane coquillière et à l'albumine, où ils sont le fait, autant d'un pigment par lui-même fluorescent, que d'une propriété physique inhérente à la molécule d'albuminoïde. On sait en effet que certaines globulines possèdent cette propriété à un haut degré. En ce qui concerne l'albumine de l'œuf, les conditions dans lesquelles se produit sa fluorescence ont donné lieu à une application pratique tout à fait curieuse.

Van Waegeninck et J.-E. Heestermann (146) ont remarqué que cette fluorescence dépendait beaucoup de l'âge de l'œuf ; nulle au moment de la ponte, elle apparaît dès le lendemain et augmente, de jour en jour, pendant un mois environ. Ces auteurs ont trouvé là un moyen original de reconnaître la fraîcheur des œufs : ils évaluent photométriquement l'intensité de fluorescence de leur albumine et la comparent à celle que donnent des solutions de gélatine faites à des titres croissants : 0,05 — 0,10 — 0,25 — 0,50 — 1 gr. — 2 gr. 50 — 10 gr. %. On peut ainsi recueillir, concernant l'âge de l'œuf, des indications d'autant plus précieuses qu'il n'existe, dans ce but, aucune autre méthode efficace.

L'examen, en lumière de Wood, de nombreux œufs d'origine variée, m'a permis d'observer la fluorescence de leur albumine. Nulle en effet dans les œufs très frais, elle ne devient intense qu'un mois environ après la ponte et présente alors une coloration jaune bleuâtre, d'aspect laiteux. Son spectre est constitué par une large bande, mal délimitée, intense surtout dans le bleu, mais s'étendant jusqu'aux limites de l'orangé et du rouge. Une seule exception aux caractères précédents m'a été toutefois fournie par l'œuf de goéland, dont quelques échantillons, assez rares, renfermaient une albumine possédant une belle fluorescence verte, visible déjà à la lumière du jour, mais beaucoup plus forte en lumire de Wood (*). A quoi pouvait être due cette propriété, dans des œufs fraîchement pondus et paraissant en excellent état de conservation ? Fallait-il l'attribuer à la présence de bactéries, ensemencées dans l'utérus de l'oiseau et dont les colonies possèderaient, comme celles du bacille pyocyanique, une semblable fluorescence ? Une telle origine paraissait douteuse, vu la limpidité et la transparence parfaite de l'albumine examinée. Un pigment particulier pouvait-il être mis en cause ? La faible quantité d'albumine dont je disposais ne m'a pas permis d'étudier la question et d'entreprendre une extraction de pigment difficile et d'issue incertaine.

Mais, si l'on se borne au cas général, représenté par l'albumine de l'œuf de poule, deux facteurs paraissent intervenir pour en provoquer la fluorescence. L'un, propriété intrinsèque des albuminoïdes, développe une teinte bleuâtre, croissant avec l'âge de l'œuf ; quant à l'autre, il appartient à un pigment spécial, isolé du blanc d'œuf par R. Kühn, P. Györgyi et Th. Wagner-

(*) G. Bernheim (8) a déjà signalé une fluorescence analogue dans l'albumine de certains œufs de cané.

Jauregg (**88 bis**) qui lui ont donné le nom d'ovoflavine. Ce pigment, très voisin de la lactoflavine du petit-lait appartient au groupe des flavines et s'identifie peut-être à la vitamine B2. Sa composition chimique répond à la formule : $C^{17} H^{20} N^4 O^6$ et il possède comme tous les corps de cette famille : les lyochromes, une forte fluorescence jaune verdâtre qui, éteinte par les acides et les bases fortes, se modifie notablement sous l'influence de l'irradiation ultra-violette.

Il semble bien que cette ovoflavine, relativement abondante dans le blanc d'œuf de poule, l'est beaucoup moins dans les œufs de cane, d'oie ou de cygne, tous ces œufs qui, en un mot, ne renferment dans leur coquille, que des traces de porphyrine. Sans vouloir formuler de conclusion hâtive à son égard, il y a là une coïncidence qui mérite d'être signalée.

III - Fluorescence de la membrane coquillère

Cette membrane, située immédiatement au-dessous de la coquille calcaire, est translucide et résistante, surtout lorsque l'œuf a été durci par la cuisson. Elle présente toujours, aux rayons ultra-violets une belle fluorescence bleu ciel observée pour la première fois par Lehmann et particulièrement intense dans les œufs dont la coquille est entièrement blanche (oie, pigeon, etc.). Son spectre apparaît constitué d'une large bande qui s'étend depuis le milieu du violet jusqu'au début du vert (Pl. III, fig. 8)

limites extrêmes : 402 — 408 $m\mu$ (axe $\lambda = 445 m\mu$).

Cette propriété se conserve très longtemps dans la membrane coquillère ; elle paraît toutefois s'atténuer beaucoup par une exposition prolongée à la lumière solaire.

Dans ce cas, la fluorescence paraît être encore une propriété physique des albuminoïdes. Les recherches de Dhéré ont montré que la plupart des substances appartenant à ce groupe absorbaient fortement les radiations ultra-violettes ; il n'y a donc rien d'étonnant à ce qu'elles en transforment une partie en lumière visible. Mais, alors que certains albuminoïdes, tels que la gélatine et l'élastine possèdent, comme la membrane coquillère, une fluorescence intense, d'autres n'en présentent qu'une très faible : la caséine et les albumines du sang appartiennent à cette catégorie. Peut-être y a-t-il un rapport entre la constitution chimique de ces albuminoïdes et leur pouvoir fluorescent ; peut-être même une analyse spectrale minutieuse permettrait-elle une étude plus comode de leurs transformations et de leurs produits de désintégration.

Conclusion

L'étude de ses pigments et de ses matières albuminoïdes nous présente l'œuf des oiseaux comme un milieu essentiellement fluorescent. Ses différentes parties transforment l'ultra-violet solaire ou artificiel en trois sortes de radiations secondaires :

Rouges, pour la porphyrine de la coquille et du vitellus ;

Jaunes et vertes, pour la lutéine du vitellus ;

Bleues et jaunes, pour l'albumine et la membrane coquillière.

Malgré l'importance que présentent au point de vue théorique ces diverses fluorescences, il faut reconnaître que leur signification physiologique est encore assez obscure. Cependant, si l'on envisage le mode de vie et le rôle biologique de l'œuf, il n'est point téméraire d'émettre à leur égard une simple hypothèse. Il est permis de penser qu'elles ont leur raison d'être dans cet état de vie ralentie qui va de la ponte à l'incubation et surtout dans cette période d'activité cellulaire extrême qui correspond au développement de l'embryon. Les transformations qui se produisent à ce moment-là et auxquelles participe même le calcaire de la coquille, exigent peut-être, pour s'accomplir, une énergie lumineuse considérable, énergie sélectionnée en quelque sorte par les substances fluorescentes de l'œuf. Les radiations secondaires émises par les porphyrines et les lutéines seraient ainsi les catalyseurs de certaines réactions complexes destinées à élaborer les constituants chimiques de l'embryon. Elles joueraient le rôle du sensibilisateur pour les plaques photographiques qui, grâce à la présence de pigments fluorescents, se laissent impressionner par des radiations, auparavant inactives sur elles. Ce que l'on sait déjà des propriétés photosensibilisatrices des porphyrines autorise, dans ce domaine, toutes les suppositions, si hasardeuses et si prématurées qu'elles puissent paraître.

— — — — .

DEUXIÈME PARTIE

LES PORPHYRINES
AGENTS DE PHOTSENSIBILISATION

Etude de la Photosensibilisation biologique

I - La Pathogénie de la Lumière

Un exemple typique de photosensibilisation nous est donné par l'expérience classique d'Haussmann (76). Il a observé sur des souris blanches exposées au soleil, après injection d'hématoporphyrine, la gamme des accidents suivants :

1° **Forme foudroyante** (Lichtschlag), semblable à une attaque d'apoplexie, avec coma et mort en quelques minutes.

2° **Forme aiguë** (akute Form), avec érythème des oreilles, œdème des paupières, convulsions, coma et mort en quelques heures.

3° **Forme subaiguë** (subakute Form), caractérisée par des œdèmes cutanés et quelques foyers de nécrose superficiels. Guérison plus ou moins rapide.

4° **Forme chronique** (chronische Form), dans laquelle l'animal ne présente qu'une légère nécrose cutanée souvent limitée aux oreilles et sans retentissement sur l'état général.

Il faut bien dire que dans la pathologie humaine, les formes aiguës sont rares, et si l'on observe des photosensibilisations d'origine variée, elles se bornent le plus souvent à des dermatoses, caractérisées essentiellement par des lésions plus ou moins profondes de l'épiderme, accompagnées ou non de mélanodermie réactionnelle. En même temps, ces accidents locaux peuvent influencer tout l'organisme du sujet qui présente alors de la céphalée, des vertiges, des vomissements, tout le syndrome de l'insolation ou coup de chaleur, quoique l'origine du phénomène soit bien différente. Elle suppose en effet, outre l'action des radiations lumineuses, la présence d'un photosensibilisateur, introduit de diverses manières dans l'organisme. En se basant sur ce fait, Jausion (79) a pu établir une bonne classification (*) de tous les états pathologiques imputables plus ou moins directement à la lumière.

Le photosensibilisateur peut être :

a) **endogène**, c'est-à-dire apparaître dans l'organisme atteint, soit spontanément, soit par ingestion d'un produit par lui-même photo-inactif ;

(*) A laquelle sont empruntées, dans ce paragraphe, plusieurs descriptions de cas pathologiques.

b) **exogène**, à la suite de l'introduction d'un photocatalyseur par voie cutanée, endoveineuse ou digestive.

A) Au premier groupe se rattachent les porphyrinuries spontanées et les oochronoses animales. A la suite d'une production excessive de porphyrine (dans l'intestin, aux dépens peut-être des pigments biliaires) cette porphyrine qui est à l'état normal détruite par le foie, passe dans l'urine ou bien se concentre dans les os, qu'elle colore en brun plus ou moins intense (oochronose). Dans ces deux cas, se produisent des troubles caractéristiques, déclenchés par exposition du patient à la lumière. En premier lieu, ce sont les porphyrinuries spontanées de l'homme auxquelles on a donné des noms variés : hydroa vacciniiforme (Bazin) **(7)** dermatites récidivantes d'hiver et d'été (Hutchinson **(77)**, Crocker **(22)**, Brocq) **(17)** ; aux symptômes généraux du coup de soleil : fièvre, vomissements, céphalée, succède une éruption de pustules, intense surtout dans les parties découvertes du corps, et qui laissent aux malades des cicatrices analogues à celles de la variole. Dans tous ces cas, on n'a jamais pu, malgré le taux parfois élevé de la porphyrine dans l'urine, en déceler des traces appréciables dans le sang, ce qui paraît démentir son origine hématique.

L'oochronose, qui a été bien étudiée chez les animaux de boucherie par Fink **(57)**, se caractérise par une imprégnation intense du tissu osseux d'une substance brune qui a été identifiée spectrophotométriquement à l'uroporphyrine. Ce pigment, extrait des os et injecté à de jeunes animaux en voie de croissance, reproduit sur eux les accidents de l'oochronose (Fraenkel). Ceux-ci se traduisent, chez l'animal, par de la photophobie, un amaigrissement intense et rapide, des œdèmes avec chute des poils et enfin de la cachexie toujours mortelle.

Mais, la porphyrinurie la mieux connue est celle qui, provoquée par ingestion de certains médicaments appartenant à la série des urées substituées (véronal, dial, sulfonal, gardénal, somnifène, etc., etc.), constitue le barbiturisme expérimental. Découverte par Woolley, en 1907, à la suite d'absorption de sulfonal, cette affection a suscité une foule de travaux et a été également bien observée chez l'homme et chez les animaux. Elle se caractérise, chez l'homme intoxiqué, par une inflammation de la peau avec des érythèmes marqués surtout dans les régions exposées à la lumière vive. En même temps se produit une fièvre intense pouvant aboutir, dans les cas graves, au coma et à la léthargie, comme ont pu l'observer Tardieu **(132)** et Blondel, chez un sujet qui avait absorbé 2 gr. 10

de dial à la fois. Chez les animaux, l'influence de la lumière est encore plus marquée dans les troubles produits par l'ingestion de sulfonal : les expériences d'Hausmann sont concluantes à cet égard. Des rats blancs, nourris avec du sulfonal présentent les accidents caractéristiques dès qu'ils sont exposés au soleil alors que des rats noirs, dans les mêmes conditions, ne sont pas atteints. D'autres auteurs ont poussé plus loin leurs observations : Linser et Ehrmann ont noté la porphyrinurie intense des lapins sulfonalisés ; Kagawa et Nimura ont observé de plus la chute des poils et leur régénération incomplète chez des animaux traités de la même manière. Fabre et Simonnet (54) ont même vu la vésicule biliaire d'un lapin sulfonalisé remplie d'une liquide fluorescent en rouge, en lumière de Wood, et dans lequel ils ont pu identifier et doser spectrophotométriquement l'hématoporphyrine.

Derrien enfin a pu constater chez certains oiseaux nocturnes (chevêche) une augmentation de la porphyrinurie, si on leur fait ingérer de l'oxyde de zinc en même temps que du sulfonal ; la porphyrine est éliminée en ce cas sous forme de complexe zincique.

Le mécanisme de l'intoxication barbiturique est à peu près complètement inconnu. La formation de porphyrine est vraisemblablement en rapport avec une destruction massive d'hématies et d'hémoglobine, mais on ne peut dire si ce phénomène est d'ordre primaire ou secondaire, en un mot si les accidents observés proviennent de l'abaissement du nombre d'hématies dans le sang ou de la porphyrine mise en liberté. Il semble cependant que la seconde hypothèse est la plus logique. Les symptômes du barbiturisme sont en effet très voisins de ceux que l'on observe après une injection d'hématoporphyrine : il y aurait production dans le foie d'une quantité exagérée de cette substance, dont une partie produirait dans l'organisme les accidents caractéristiques et dont l'excès serait éliminé par l'urine du sujet. Il reste bien entendu à expliquer comment le sulfonal ou les corps de cette série peuvent séparer « in vivo » la porphyrine de l'hémoglobine du sang (*).

(*) Certains auteurs ont cru attribuer au tissu hépatique cette production d'hématoporphyrine sous l'influence du sulfonal : ils ont mélangé une petite quantité de ce produit à de la pulpe de foie et placé le tout, pendant plusieurs jours, à l'étuve à 37°. Mais ils n'ont jamais pu déceler ainsi la moindre trace de porphyrine, ce qui montre bien que le mécanisme de sa production est beaucoup plus complexe et ne peut se ramener à une simple action diastasique. Inversement, nous verrons que Fabre et Simonnet ont pu, au moyen de l'hématoporphyrine, conférer un pouvoir hémolytique puissant à des corps qui, comme la lécithine, en sont normalement dépourvus.

Il semble que l'état de « porphyrisme » de la poule qui pond des œufs dont la coquille est fortement imprégnée d'ooporphyrine pourrait se ramener à une porphyrinurie analogue, spontanée ou provoquée par un photo-sensibilisateur de nature inconnue. Elle s'en rapprocherait par le mode de formation primitif de la porphyrine, mais s'en séparerait par le mode d'élimination, puisque Turchini a montré que ce pigment était sécrété dans le calcaire de la coquille par les glandes de l'utérus, et non dans le cloaque où débouchent, chez les oiseaux, les conduits urinaires.

On pourrait rapprocher enfin de cet ordre de phénomènes, le cas très particulier d'un ver Géphyrien (*Bonellia viridis*), qui renferme dans ses téguments un pigment voisin des porphyrines : la bonelline, et doué comme elles d'une magnifique fluorescence rouge (41 bis). Ainsi qu'il résulte des observations de R. Dubois, de Baltzer et de Fr. Michel, la bonelline qui possède « in vitro », sur les paramécies et les têtards, un pouvoir phototoxique très marqué, constituerait pour la bonellie elle-même un moyen de défense contre une lumière trop vive qu'elle doit fuir pour éviter une exagération de ses phénomènes d'oxydation. Ce serait là un fait analogue à celui que Derrien a signalé chez les oiseaux de nuit qui vivraient dans l'obscurité pour ne pas subir, à cause des porphyrines que renferment leur squelette et leur plumage, l'influence nocive de la lumière.

B) Dans le cas d'une photosensibilisation exogène, il y a lieu de distinguer pour l'introduction du corps actif, la voie cutanée, endoveineuse ou digestive.

Au premier groupe se rattachent les maladies professionnelles des ouvriers manipulant le goudron ou ses dérivés et qu'une lumière intense paraît considérablement aggraver. On a incriminé en ce cas les propriétés fluorescentes de l'acridine que renferment beaucoup de goudrons. Mais les travaux récents de Cook (141) sur les carbures cancérogènes paraissent rattacher plutôt ce phénomène au problème du cancer ; si la lumière est à l'origine des nécroses cutanées produites par le goudron, ces nécroses finissent toujours par aboutir à des épithéliomas, qui n'offrent plus qu'un rapport lointain avec la photosensibilisation primitive. Il faut signaler aussi certaines éruptions printanières bien étudiées par Sabouraud en 1913, et qui, provoquées par le contact des feuilles de certaines primevères (*Primula obconica*, *sinensis*, *cortusoides*), se traduisent, chez certains sujets prédisposés, par des œdèmes et des rougeurs qui atteignent presque exclusivement les régions décou-

vertes de la peau et se terminent souvent par un eczéma chronique. L'étiologie de cette affection l'apparente à certains phénomènes anaphylactiques, tels ceux qui occasionnent le rhume des foins à partir du pollen des graminées. La photosensibilisation n'intervient plus, ici encore, que comme une circonstance aggravante dans un état de choc provoqué par un autre agent déclancheur. Un grand nombre d'irritations cutanées, produites par l'application de produits très variés : vaseline, eau de Cologne, sels de quinine, etc., ont été rapprochées de la maladie du goudron, quoique, plus encore que chez cette dernière, l'influence de la lumière y soit tout à fait problématique.

Beaucoup plus probants sont les faits très nombreux, observés chez l'animal, de photosensibilisation par voie digestive, et qui ont été rassemblés par Richert dans sa thèse sur « les Pellagres animales » (123). On connaît ainsi le fagopyrisme des moutons et des chèvres qui ont brouté du sarrasin (*Fagopyrum vulgare*), la trifoliose des bovins, occasionnée par le trèfle (*Trifolium hybridum* et *T. pratense*) ; et surtout, la maladie du millepertuis (38), produite par l'ingestion du rouge d'*hypericum*. Ce pigment est secrété par les chromatophores des tiges et des feuilles de l'*Hypericum perforatum* et sa fluorescence rouge, étudiée par Ch. Dhéré, le rapprocherait non pas des porphyrines, mais des flavones végétales. Dans tous ces cas, les symptômes sont les mêmes : œdèmes de la peau, abattement, dyspnée, convulsions qui n'atteignent que l'animal exposé à la grande lumière ; si on le laisse enfermé dans une étable obscure, les accidents ne se produisent pas. Des chevaux ont présenté des phénomènes de photosensibilisation analogues, après avoir ingéré de l'orge colorée par de l'éosine ; des souris également, nourries à la farine de maïs. Et c'est là un caractère qui rapprocherait cette affection d'une autre, dont les rapports avec la lumière et l'alimentation maïdique apparaissent cependant moins bien démontrés : la pellagre humaine. En réalité, les seuls faits certains de photosensibilisation par voie buccale, constatés chez l'homme, se ramènent aux observations de Prime (121) qui vit apparaître chez des épileptiques ingérant des doses croissantes d'éosine (de 0 gr. 25 à 3 grammes) des œdèmes avec ulcérations des parties découvertes du visage et des mains.

L'injection sous-cutanée ou endoveineuse d'une substance photo-active produit des accidents tout à fait comparables, quoique plus rapides. Haussmann a observé, nous l'avons vu, chez des souris blanches ayant reçu une injection sous-cutanée d'hémato-

porphyrine, de la dyspnée, de la photophobie avec rougeur et gonflement des oreilles. Saccharoff et Sachs (127) ont provoqué des accidents mortels sur des souris blanches exposées à la lumière, par des injections d'érythrosine. En médecine humaine, c'est grâce aux recherches de Jausion et Marceron (78) que la photosensibilisation au moyen des médicaments fluorescents est maintenant bien connue : l'influence en particulier de la trypaflavine ou gonacrine. Chez les malades traités avec ce dérivé de l'acridine, se produit très souvent, et seulement pendant les mois d'été, une actinite intense accompagnée d'érythème qui s'étend parfois aux régions du corps cachées par les vêtements. On observe en même temps une pigmentation jaune de la peau et une hypertrichose généralisée « qui traduisent l'aptitude réactionnelle de l'organisme sensibilisé ». Citons également les expériences faites sur lui-même par Meyer-Betz (99), qui, par injection d'une dose de 0 gr. 20 d'hématoporphyrine, provoqua après un court séjour au soleil, la formation d'un œdème intense de tout le visage, avec boursoufflement des paupières et des lèvres. Ces symptômes caractéristiques persistèrent chez lui un certain temps après l'injection.

Il faut enfin, pour être complet, mentionner les effets variés des solutions de certains colorants fluorescents sur les végétaux et les organismes inférieurs. Silvio Rebello (122), a constaté un arrêt brusque dans la croissance des bulbes de jacinthe lorsqu'on place leurs racines à la lumière, en présence d'éosine. La mort des infusoires par addition à leur milieu de culture de traces non toxiques d'acridine et d'éosine, ne se produit qu'après exposition aux radiations solaires (Von Tappeiner et Jodlbauer (133), Raab, G. Bohn et A. Drzewina). La destruction des cultures microbiennes sur milieux à l'éosine et à l'érythrosine (Mettler) démontre enfin la répartition très vaste des phénomènes de photosensibilisation.

L'influence de la lumière n'apparaît cependant pas toujours de façon aussi nette que nous venons de le voir ; il est des états pathologiques où son rôle sensibilisateur est inconnu ou problématique ; malgré l'incertitude qui règne à ce sujet, il n'est pas inutile d'en dire quelques mots. La pellagre humaine est du nombre. De répartition très étendue, mais surtout rurale, cette maladie présente des symptômes cutanés consistant en un érythème rouge sombre caractéristique localisé aux parties découvertes de la tête et des membres : la peau se fissure, se desquame et finit par présenter chez un sujet jeune un flétrissement sénile. En même temps, des accès de fièvre violente accompagnés de céphalée et de frissons

aboutissent au délire et à des troubles mentaux souvent très graves. L'étiologie de la pellagre a fait couler des flots d'encre et a donné lieu à plusieurs théories très différentes : il est cependant admis qu'elle sévit exclusivement pendant les mois de grande activité solaire (avril-octobre) et surtout chez les populations dont le maïs, sous forme de farine ou « polenta » constitue la base de l'alimentation. Quant à la cause première du « mal del sole », elle est indécise. Pour C. Funck (68), ce serait une avitaminose, comparable au béri-béri et au scorbut, et due à la carence de vitamine B₂. Pour d'autres, au contraire, ce serait bien un exemple de photosensibilisation, mais la nature du catalyseur est inconnue. Faut-il attribuer ce pouvoir aux champignons microscopiques (*Aspergillus*, *Penicillium*) qui parasitent fréquemment le maïs et secrèteraient alors une mycoporphyrine (*) analogue à celle que Fischer et Niemann ont retirée du *Penicillium clavariaeformis* ? Est-elle due aux substances fluorescentes que renferment les graines de maïs et qu'il est possible d'extraire par les solvants organiques (Douglas Mac Gay et Monroë Mac Iver) (48), substances qui montrent « in vitro » un pouvoir hémolytique marqué ? Il paraît difficile de conclure. Nous avons bien vu que les caroténoïdes du maïs, extraits par le chloroforme ou l'acétone, présentaient en lumière de Wood une forte fluorescence verdâtre, mais d'autres très voisins, tels que la lutéine du jaune d'œuf ne paraissent pas avoir jamais occasionné d'accidents imputables à la lumière. D'autre part, les très petites quantités de porphyrines secrétées par les moisissures paraissent peu de chose en regard des doses d'hématoporphyrine qu'il est nécessaire d'employer pour produire chez l'homme des accidents moins durables. En résumé, on peut conclure avec Haussmann que si, dans la pellagre, l'action sensibilisatrice de la lumière n'est pas absolument impossible, elle reste par contre assez invraisemblable. Plus problématique est encore cette influence dans une affection très rare : le xéroderma pigmentosum, qui atteint de préférence, d'après Finger, les enfants issus de mariages consanguins. Chez ces enfants, apparaissent, outre une coloration foncée du squelette (analogue à celle que l'on observe dans les oochronoses animales), des lésions cutanées qui se transforment peu à peu, surtout si elles sont exposées fréquemment à la lumière du soleil, en épithéliomas cancéreux, amenant en général la mort du sujet avant la puberté (**).

(*) Qui n'est pas une porphyrine, au sens chimique du mot.

(**) Haussmann reconnaît n'avoir jamais rencontré dans l'urine de ces enfants ni porphyrine ni porphyrinogène.

Enfin, si dans quelques maladies, la lumière ne joue aucun rôle primordial, elle peut cependant influencer l'apparition de certains caractères importants. C'est le cas de la variole et de la varicelle. L'action antagoniste de l'obscurité et des radiations rouges sur l'éclosion des pustules a permis à Finsen et à C. Würtzen d'instituer un véritable traitement de ces affections, basé sur l'isolement du malade vis-à-vis des rayons chimiques du spectre, exactement comme « le photographe protège ses plaques et ses papiers ». Mais, si ces considérations présentent le plus grand intérêt pour la pathogénie des fièvres éruptives, elles sortent par trop du cadre de la photosensibilisation proprement dite, telle qu'elle est envisagée ici.

II - Mécanisme de la Photosensibilisation

Par cet exposé, cependant restreint et schématisé des phénomènes de photosensibilisation, on peut juger de leur complexité, encore plus grande si, comme l'on fait certains auteurs, on les confond avec le coup de soleil et le coup de chaleur, dont le mécanisme et les symptômes sont pourtant bien différents. J. Risler et Foveau de Courmelles (125) ont donné à ces divers états pathologiques causés par la lumière le nom de « choc radiant », mais ils en distinguent nettement deux catégories :

a) Le choc radiant primaire, lorsque la lumière suffit à elle-seule pour produire, chez le sujet atteint, la fièvre, la courbature et l'état nauséeux consécutif à un ébranlement nerveux ;

b) Le choc radiant secondaire, lorsque par injection ou ingestion, des pigments fluorescents, des médicaments ou des aliments variés provoquent des réactions dont le « seuil » est abaissé par la lumière.

Ce dernier cas sera pour nous le critérium indispensable pour délimiter exactement le domaine de la photosensibilisation. A elle n'appartiendront que les phénomènes réunissant les trois caractères suivants :

- 1° Un sujet réceptif ;
- 2° L'influence des radiations lumineuses ;
- 3° La présence d'un photosensibilisateur.

Sans doute peut-on objecter que dans certains cas, il ne faut

pas, sous prétexte que l'on ne connaît pas le photosensibilisateur, nier à priori son existence possible. Rien ne permet d'affirmer par exemple que, si certains sujets sont particulièrement sensibles aux actinities ou coups de soleil, ils ne le doivent pas à la présence d'un photocatalyseur d'origine alimentaire ou même propre à leur organisme. Cependant, il est préférable de se limiter aux seuls cas pathologiques dans lesquels est actuellement bien démontrée l'existence des trois facteurs, mentionnés plus haut et que nous allons étudier en détail.

1° Sujet réceptif. — La photosensibilisation est, nous l'avons vu, un phénomène très général pouvant atteindre des organismes appartenant aux groupes zoologiques ou botaniques les plus divers : depuis les infusoires jusqu'aux animaux supérieurs et à l'homme, des bactéries aux phanérogames, chez les végétaux (*). Les effets varient évidemment suivant qu'on s'adresse à un organisme mono- ou pluricellulaire. Le premier, constitué d'une seule cellule non différenciée, est beaucoup plus rapidement et gravement atteint ; les modifications néfastes paraissent se produire surtout dans la membrane : hémolyse des hématies, immobilisation des paramécies. Pour ces dernières, les expériences de Dognon (46, 47) sont significatives : les sensibilisateurs, si actifs soient-ils (Rose de Magdala) ne traversent pas la paroi cellulaire de l'infusoire, même après plusieurs jours de contact et ne peuvent pénétrer dans le protoplasma. Leur action paraît être surtout d'ordre physique : il y aurait adsorption du colorant à la surface de la paramécie, puis, sous l'influence des radiations lumineuses, altération probable de l'état colloïdal de la membrane. Le fait que les photocatalyseurs agissent comme tels à des doses infiniment plus faibles que celles à laquelle ils deviennent toxiques vient à l'appui de cette hypothèse.

Chez les animaux supérieurs, le mécanisme de l'intoxication lumineuse est plus complexe, car il intervient alors une sélectivité cellulaire commune à toutes les intoxications. Deux catégories de tissus sont principalement frappées : l'épithélium cutané, sans doute parce qu'il est le plus exposé aux radiations nocives, et les centres nerveux, par retentissement secondaire. En ce qui concerne ces derniers, l'allure des symptômes de la photosensibilisation

(*) Supniewski a démontré que l'hématoporphyrine pouvait exercer son action photosensibilisatrice même sur les ferments, dont elle arrête, à la lumière, l'activité chimique.

permet de croire qu'ils dépendent dans une large mesure du système sympathique. L'étude des radiations actives va maintenant nous permettre de mieux approfondir leur rôle, en tenant compte de leur longueur d'onde et de leur pouvoir pénétrant.

2° Les radiations actives dans la Photosensibilisation. —

Ces radiations peuvent appartenir a priori à tout le spectre solaire, visible et invisible, mais leur nature et leur identité sont essentiellement variables suivant le pouvoir absorbant de l'atmosphère. Ce dernier tend en effet pour diverses causes, dont la principale est la présence d'ozone, à éliminer du rayonnement qui le traverse les parties extrêmes de l'infra-rouge et de l'ultra-violet. Les expériences de Fabry et Buisson (55) ont montré que le spectre solaire très intense dans la région ultra-para-violette, s'arrêtait complètement vers $2.900 \text{ \AA}$, par suite du pouvoir absorbant de l'ozone compris entre 2.900 et $2.300 \text{ \AA}$, et de celui de l'oxygène, vraisemblablement actif au-dessous de $2.500 \text{ \AA}$. Il en résulte que si les radiations solaires reçues par les êtres vivants varient légèrement en qualité et en quantité suivant la saison, le lieu ou l'altitude, elles sont toujours comprises entre 2.900 et $10.000 \text{ \AA}$ environ. Entre ces limites se place donc toute une gamme de rayons, dont chaque région possède des propriétés biologiques bien déterminées. A laquelle peut-on attribuer les phénomènes de photosensibilisation ? Quelle est la longueur d'onde la plus active dans ce sens ? La divergence des opinions exprimées à ce sujet oblige à un examen approfondi de la question, qui se montre d'autant plus complexe que la zone des radiations actives varie, dans une assez large mesure, d'un photocatalyseur à l'autre.

a) Faut-il admettre tout d'abord que les radiations actives sont précisément celles qui sont absorbées par le photosensibilisateur. Ici déjà, les avis sont partagés. S'il était admis depuis longtemps que dans certains phénomènes photochimiques, tels que l'assimilation chlorophyllienne, la plus grande activité se trouve sous les radiations les plus fortement absorbées par le pigment, il n'en va plus de même pour la photosensibilisation. A la loi générale : « N'agissent que les rayons absorbés » (*) s'opposent les expériences de Dognon (46). Si on interpose entre la lumière solaire et des paramécies sensibilisées à l'éosine, un écran constitué par une solution de cette même éosine (qui absorbe toutes les radiations comprises entre 420 et $550 \text{ m}\mu$) la mort des infusoires est légè-

(*) Conclusions de Dreyer et Tappeiner.

ment retardée, mais se produit tout de même. De plus, si on emploie pour des paramécies sensibilisées à l'éosine un écran au vert Lumière (zone d'absorption : 540 — 650 $m\mu$), on obtient le même allongement du temps de mort, quoique les radiations absentes soient très en dehors de la bande d'absorption du sensibilisateur. Il semble donc qu'un pigment ou un colorant puisse agir par d'autres radiations que celles qu'il absorbe ; les travaux récents de Wurmser sur la chlorophylle ont du reste démontré qu'elle possède un rendement maximum en dehors de ses bandes d'absorption.

2° Les radiations actives dans la photosensibilisation appartiennent-elles à la région ultra-violetle du spectre ? Des raisons sérieuses militent en faveur de cette hypothèse. En effet, la plupart des substances photoactives sont fluorescentes et cette fluorescence est excitée précisément par les radiations inférieures à 380 $m\mu$: tel est du moins le cas pour les porphyrines. Mais, si on s'adresse à l'éosine et à l'érythrosine, très actives également, leur fluorescence est produite davantage par des radiations visibles que par l'ultra-violet.

D'autre part, on a voulu parfois assimiler les accidents par photosensibilisation à ceux provoqués par l'ultra-violet solaire ou artificiel : à l'épidermite actinique. Cependant, les symptômes en sont tout à fait différents et l'évolution de l'affection n'est pas la même. Plusieurs raisons empêchent donc d'incriminer exclusivement les radiations ultraviolettes, en particulier l'imperméabilité de la peau à leur égard. Ces rayons, complètement arrêtés par la couche cornée de l'épiderme n'ont qu'un pouvoir de pénétration excessivement faible et provoqueraient difficilement la photosensibilisation qui, outre ses manifestations cutanées présente des phénomènes généraux indiquant une modification profonde de l'organisme. Sans doute pourrait-on admettre avec Biancani (9) que, si l'action des rayons ultra-violets s'arrête aux premières cellules de l'épiderme, elle n'en produit pas moins sur elles, grâce à l'énorme énergie lumineuse employée, un déséquilibre chimique et colloïdal considérable. Cette destruction cellulaire provoquerait la mise en liberté de substances toxiques qui, transportées par l'appareil circulatoire, réagiraient sur les tissus sous-cutanés, puis sur l'organisme tout entier. Il se produirait alors une intoxication à distance analogue à celles que l'on observe dans les brûlures graves ou très étendues. Cependant, avant d'invoquer ce mécanisme complexe, il paraît plus logique de rechercher l'action des radiations qui pénètrent facilement à l'intérieur des tissus.

3° C'est le cas des rayons infra-rouges. Très peu absorbés par l'atmosphère, puisqu'ils permettent la photographie à très grandes distances, ce sont les plus pénétrants des rayons émis par le soleil. Ils peuvent atteindre les organes les plus profonds et ce sont eux qui occasionnent l'insolation ou coup de chaleur. Richert leur attribue un rôle primordial dans l'étiologie des pellagres animales, mais sans méconnaître le rôle physiologique considérable, vasodilatateur surtout de ces radiations, il semble bien que là encore on ait confondu des états pathologiques essentiellement différents. Si les accidents dus à la photosensibilisation sont très certainement aggravés par l'élévation de la température interne, celle-ci n'en est certainement pas la cause première. Les observations cliniques montrent en effet que le soleil froid est tout aussi actif que le soleil d'été pour la formation des actinites de sensibilisation ; seule intervient l'intensité des radiations visibles et ainsi sommes-nous amenés à étudier leur influence possible.

4° Plusieurs expérimentateurs ont situé dans la région jaune et verte du spectre l'activité photosensibilisatrice des radiations solaires. Fabre et Simonnet (54) ont constaté, dans le cas de l'hématoporphyrine agissant sur les paramécies, que le maximum d'activité se trouvait vers $5.900 \text{ \AA}$. Au sujet du pouvoir hémolytique de cette même porphyrine, ils ont trouvé les radiations ultra-violettes moins actives qu'une lampe électrique riche en radiations jaunes. Haussmann et Arzt L. (3) attribuent également aux radiations jaune-vertes du spectre le pouvoir de déclencher les accidents lumineux chez les souris sensibilisées à l'hématoporphyrine et localisent la longueur d'onde active autour de $500 \text{ m}\mu$. Philibert et Risler (111) montrent le grand pouvoir catalytique, dans la photosensibilisation, de la lampe à néon très riche en radiations jaunes et orangées. Dognon enfin, opérant avec les paramécies sensibilisées à l'éosine, trouve la raie jaune de l'arc au mercure cinquante fois plus active que la raie verte, et beaucoup plus que toutes les radiations ultra-violettes réunies. Si on ajoute à ces faits que Guillaume (72) se basant sur des constatations cliniques, admet l'intervention presque exclusive des rayons visibles dans les actinites de photosensibilisation, il y a de fortes raisons d'admettre qu'elles sont dues à des radiations comprises approximativement entre 5.000 et $6.000 \text{ \AA}$, dans toute la région qui s'étend du vert à l'orangé, avec un maximum d'activité dans le jaune. Fait remarquable d'ailleurs : ces radiations sont précisément celles auxquelles l'œil humain est le plus sensible ($\lambda = 5.300 \text{ \AA}$).

Il reste maintenant quelques mots à dire de l'antagonisme des radiations. Ce phénomène a été découvert par Becquerel qui a constaté que les phosphorescences produites par les rayons ultra-violets étaient éteintes par l'infra-rouge. Cluzet et Koffmann ont observé un fait analogue sur les stérols irradiés qui perdent leur photo-activité sous l'influence des rayons infra-rouges. Cependant au point de vue biologique, l'expérimentation a abouti à des données souvent contradictoires. Si de Nobele, de Potter et Van Haelst sont parvenus à vérifier cette propriété sur les cultures microbiennes, il ne semble pas qu'au point de vue particulier de la photosensibilisation, des résultats concluants aient été obtenus.

3° Les Photosensibilisateurs. — La notion de photosensibilisation remonte aux expériences de Vogel (145) sur les plaques photographiques ; ce chimiste remarqua qu'en ajoutant à l'émulsion collodion-bromure d'argent des traces de certains colorants fluorescents, la sensibilité de la plaque, limitée auparavant aux radiations violettes et ultra-violettes, s'étendait alors jusqu'au vert et au jaune. De nombreux travaux ont montré depuis qu'il était possible de sensibiliser ainsi les plaques pour une région déterminée du spectre, en employant le pinaverdol, le pinacyanol et enfin le pantochrome de Lumière et Barbier qui les rend impressionnables à la fois par toutes les radiations visibles. La dicyanine de Höchst, la cryptocyanine de Adams et Haller, la néocyanine de Clarke permettent même la photographie jusque dans l'infra-rouge très poussé (11.000 $\text{\AA}$ environ). Cette propriété remarquable, quoique inexpiquée, permet de comprendre le mécanisme de la sensibilisation biologique qui présente avec elle de grandes analogies.

Un exemple frappant de cette ressemblance nous est donné par Jausion et Pagès (80) : c'est celui des algues rouges vivant dans la mer, à des profondeurs où les radiations rouges, absorbées les premières par la masse liquide, ne peuvent plus leur parvenir. Pour lutter contre l'absence de ces rayons, indispensables à l'assimilation chlorophyllienne, ces algues possèdent un pigment fluorescent en rouge : « La phycoerythrine qui, recouvrant la couche de chlorophylle, transforme pour elle les radiations bleues et permet le jeu de l'assimilation. »

Tout permet de croire que les sensibilisateurs photographiques sont biologiquement très actifs (*), mais par contre il n'y a pas

(*) Inversement, Eder (49) a montré que l'hématoporphyrine possédait un pouvoir sensibilisateur puissant sur les plaques au gélatino-chlorure d'argent.

identité absolue entre la fluorescence et le pouvoir photocatalytique. Si la plupart des sensibilisateurs biologiques sont des colorants fluorescents, on connaît cependant des exceptions, parmi lesquelles il faut citer principalement : la chlorophylle, le bleu de méthylène et la fluorescéine.

A) Le cas de la chlorophylle paraît au premier abord fort complexe, mais des travaux récents l'ont un peu éclairci. Willstätter avait reconnu à ce pigment, vis-à-vis des hématies, un pouvoir hémolytique très marqué. E. Bürgi (8) lui attribue au contraire, lorsqu'il est absorbé « per os » un rôle stimulant dans la circulation sanguine et la régénération des hématies, une influence favorable sur le métabolisme basal et la diurèse. Plusieurs auteurs ont été ainsi amenés à prescrire, contre divers états anémiques, l'ingestion, soit de légumes verts en abondance, soit de chlorophylle extraite chimiquement de ces mêmes légumes : les résultats obtenus se sont alors montrés tout à fait contradictoires. La question se complique d'abord de ce fait que les préparations commerciales de chlorophylle sont très souvent dépourvues de fluorescence, parce qu'elles sont obtenues dans des récipients en cuivre : des traces de ce métal suffisent pour produire un complexe non fluorescent et par suite physiologiquement inactif. Quant à la contradiction qui résulte de l'ingestion inoffensive des légumes verts et de la toxicité de la chlorophylle pure, elle a été expliquée par une hypothèse assez vraisemblable de A. C. Guillaume (72). Pour cet auteur, la chlorophylle est renfermée, chez la plante, dans des cellules qui ne sont détruites qu'au niveau de l'intestin grêle, où elles libèrent alors seulement leur pigment, tandis qu'absorbée directement par voie buccale, la chlorophylle peut agir déjà dans l'estomac et le duodénum et « s'y mélanger aux humeurs ». On peut donc supposer que l'activité du suc intestinal s'exerce assez rapidement sur la chlorophylle, pour la dédoubler et lui faire perdre son pouvoir photocatalytique. Des expériences toutes récentes montrent bien que la chlorophylle pure, appliquée sur une région dénudée de la peau, y provoque la formation d'érythèmes, si la lumière solaire entre en jeu : elle se comporte donc comme un photosensibilisateur actif et ce caractère contribuera certainement à restreindre ses applications en thérapeutique.

B) En ce qui concerne le bleu de méthylène, ce colorant, qui sensibilise énergiquement les paramécies à la lumière, ainsi que le cœur de grenouille « in situ » (J. Cuzin), ne paraît pas avoir jamais occasionné, en médecine humaine, même à des doses élevées et

fréquemment répétées, d'accidents imputables à l'intoxication lumineuse. Peut-être faut-il attribuer cette anomalie à la facilité que possède le bleu de méthylène de se transformer dans l'organisme en leuco-dérivé ? Et rien ne prouve à priori que des expériences plus complètes, réalisées sur les animaux supérieurs, confirmeraient les résultats obtenus avec les paramécies. Cependant, s'il était reconnu que ce colorant, quoique dépourvu de fluorescence, constitue vraiment un photosensibilisateur, il s'agirait là d'une exception comme il s'en rencontre tant, chaque fois que l'on essaie d'asservir à des lois les phénomènes biologiques.

C) Le cas de la fluorescéine est tout aussi difficile à résoudre. Elle est chimiquement le noyau de plusieurs colorants qui sont tous des sensibilisateurs puissants :

Eosine ou tétrabromofluorescéine ;

Erythrosine ou dibromoiodofluorescéine ;

Rose de Magdala ou tétraiodofluorescéine,

alors qu'elle-même, malgré sa très forte fluorescence verte, serait incapable de déclancher le coup de lumière. Peut-être faut-il voir dans cette anomalie la conséquence d'une constitution moléculaire contrariante. On sait que, pour la plupart des corps chimiques physiologiquement très actifs, leurs propriétés sont dues à une disposition atomique rigoureusement déterminée. Les travaux récents sur l'adrénaline (Tiffeneau) et les carbures cancérogènes (Cook) sont à ce point de vue particulièrement probants ; il existe dans l'architecture moléculaire de ces corps des noyaux, des groupements volumineux sans importance pharmacodynamique, à côté de radicaux et de chaînes latérales auxquelles on ne peut toucher sans voir s'écrouler toute leur activité biologique. Peut-être un phénomène analogue se produit-il dans le cas de la fluorescéine et du bleu de méthylène.

Ces considérations nous amènent à une conception plus large de la molécule photosensibilisatrice. Si ses propriétés physiologiques ne peuvent s'identifier complètement à son pouvoir fluorescent, elles paraissent être cependant le fait d'un noyau fluorophore pyrrolique ou pyridinique



qui se retrouve dans tous les pigments ou colorants photoactifs. Mais si, dans la majorité des cas, fluorescence et pouvoir sensi-

lisateur vont de pair (éosine, trypaflavine, porphyrine), plusieurs facteurs peuvent intervenir pour annihiler l'une ou l'autre de ces propriétés, ou même les deux à la fois. Il faut ainsi envisager : la présence d'un atome métallique dans la molécule du sensibilisateur, l'addition d'un anti-oxygène et l'état colloïdal du pigment photo-actif. Le premier cas, spécial aux porphyrines, sera étudié en détail au chapitre suivant, et envisagé au double point de vue physique et biologique ; qu'il suffise de dire pour l'instant que c'est à son atome de Fer que l'hématine doit de ne point être un photosensibilisateur.

L'action antagoniste de certains composés chimiques présente un intérêt d'autant plus grand que ce sont tous des révélateurs photographiques. Nous avons vu que certains agents « anti-oxygène » « éteignaient » la fluorescence ; ils peuvent aussi supprimer chez les mêmes pigments le pouvoir photosensibilisateur. Les expériences de K. Noack (106), avec le sulfite de sodium et l'hydroquinone, celles de Jausion, Marceron et Pecker (96), avec la résorcine et la pyrocatechine sont à cet égard tellement concluantes que ces réducteurs puissants constituent le meilleur moyen de traitement des états pathologiques provoqués par la lumière. C'est là un caractère qui rapproche singulièrement les deux phénomènes connexes : fluorescence et photosensibilisation.

Il est aussi une propriété qui, quoique d'ordre physique, peut intervenir physiologiquement : c'est l'état colloïdal du pigment photo-actif. Ainsi, les porphyrines, fluorescentes à l'état de solutions vraies, perdent cette fluorescence dans leurs pseudo-solutions ; Dhéré voit dans cette propriété un moyen de défense contre la photosensibilisation pour certains organismes qui possèdent des porphyrines dans leurs téguments (11). « Ainsi, dit-il, les êtres vivants disposeraient de deux moyens pour annuler la fluorescence des porphyrines et supprimer les phénomènes de photosensibilisation : soit la combinaison des porphyrines avec le fer ou le cuivre (cas bien connus), soit le dépôt, dans les tissus superficiels, des porphyrines à un état colloïdal excluant la fluorescence. »

Pour conclure, il semble que le mécanisme physiologique de la photosensibilisation ne peut se ramener à une explication purement physique, analogue à la sensibilisation chromatique des plaques photographiques. Le phénomène est beaucoup plus complexe, car il s'adresse à la cellule vivante dont les aptitudes réactionnelles sont infiniment plus variées. Nous avons vu que les catalyseurs lumineux agissaient à des doses auxquelles il est impos-

sible d'incriminer leur toxicité propre. On ne peut pas davantage attribuer leur effet nocif à l'activité des radiations secondaires émises par eux, radiations qui, reçues à l'état normal par l'organisme avec une intensité beaucoup plus grande, paraissent inoffensives, lorsqu'elles sont des radiations primaires. Sans doute le corps fluorescent agit-il de façon plus profonde encore que par sa fluorescence, en modifiant tout le fonctionnement du système sympathique et en abaissant le seuil de son excitabilité par certaines radiations lumineuses, normalement peu actives.

Il est probable que d'autres facteurs entrent également en jeu, notamment cette propriété remarquable que possèdent les substances fluorescentes de catalyser et d'accélérer dans une large mesure les photooxydations (travaux de H. Gaffron) (69 bis).

D'après cet auteur, le sérum de cheval et la caséine, placés à la lumière électrique, en présence d'hématoporphyrine ou de chlorophylle, absorbent l'oxygène et dégagent de l'anhydride carbonique et de l'ammoniaque. L'hématine par contre, ainsi que la chlorophylle sous forme de complexe cuprique non fluorescent, sont totalement inactives. Gaffron attribue donc les accidents de photosensibilisation, chez l'être vivant, à une destruction des albumines par photooxydation, soit à l'intérieur des cellules, soit dans le plasma sanguin.

Cette opinion serait confirmée par certaines expériences d'Hausmann, qui a pu conserver à la vie des souris sensibilisées et exposées à la lumière, en abaissant la pression de l'oxygène qu'elles respiraient. C'est vraisemblablement dans cette voie qu'il faut chercher à l'heure actuelle l'explication des phénomènes pathologiques dus à la photosensibilisation.

III - Rôle sensibilisateur des Porphyrines

Nous avons vu que l'action photosensibilisatrice des porphyrines, qu'elle soit d'origine endogène ou exogène, était bien démontrée. Mais si on excepte l'uroporphyrine qui imprègne le squelette dans l'oochronose et a donné lieu à quelques expériences, l'hématoporphyrine est la seule dont l'activité physiologique soit bien connue. Sa formation dans l'organisme sous l'influence des dérivés barbituriques et en quantité telle qu'elle passe dans l'urine, peut être interprétée comme une intoxication porphyrique. Mais si on envisage l'introduction de l'hématoporphyrine elle-même par voie sous-cutanée ou digestive, un grand nombre d'expériences

ont prouvé son activité photosensibilisatrice puissante, supérieure à celle de l'éosine et de l'érythrosine. Fabre et Simonnet ont montré non seulement son rôle hémolytique vis-à-vis des hématies exposées à la lumière, mais encore la faculté qu'elle possède de rendre photoactives des substances qui normalement ne le sont pas, la lécithine par exemple.

Cuzin (23) a reconnu à l'hématoporphyrine un rôle sensibilisateur beaucoup plus actif que celui de l'éosine et du bleu de méthylène, vis-à-vis du cœur de grenouille « in situ » et de l'intestin de lapin. Les travaux de Meyer-Betz et d'Hausmann, sur l'homme et les mammifères, présentent enfin l'hématoporphyrine comme la substance-type du photosensibilisateur, celle qui ne peut se passer des radiations lumineuses pour déclencher le processus des troubles caractéristiques décrits en détail dans les précédents chapitres.

Parmi les autres pigments de ce groupe, dont Hausmann a étudié l'action photocatalytique sur les hématies et les infusoires, il faut citer la mésoporphyrine, la phylloporphyrine, la porphyrine urinaire et enfin la chlorophylle, qui toutes se sont montrées actives. Par contre, l'oxyhémoglobine et l'hématine ont donné un résultat complètement négatif. Si on rapproche de ce fait les conclusions auxquelles sont arrivés H. Fischer et Hilger (61) avec la turacine, complexe cuprique de l'uroporphyrine, « inoffensive pour les paramécies, même exposées à la vive lumière du soleil ». Si on se rappelle que Fischer et Kögl (59) n'ont obtenu également aucun résultat avec l'éther méthylique de l'ooporphyrine et de la mésoporphyrine, on est frappé par cet ensemble de faits, dus très certainement à une cause identique : la présence d'un atome métallique ou d'un radical étranger dans la molécule de porphyrine, dont les propriétés se trouvent dès lors transformées.

1° Si on envisage la fluorescence, tantôt elle est complètement éteinte, tantôt modifiée seulement dans son spectre, plus ou moins décalé vers le jaune.

2° La stabilité à la lumière, assez faible chez les porphyrines, est considérablement renforcée dans leurs complexes métalliques.

3° Quant au pouvoir photosensibilisateur, il paraît quelquefois annihilé, même lorsque la fluorescence est conservée, comme dans le cas de l'éther méthylique de l'ooporphyrine. De nouvelles expériences permettraient peut-être de fixer ce point douteux, qui n'infirme cependant pas la règle générale de l'inactivité des complexes métalliques des porphyrines.

Expériences personnelles sur les propriétés sensibilisatrices de l'Ooporphyrine

L'ooporphyrine $C^{34} H^{34} N^4 O^4$ est chimiquement identique à la protoporphyrine qui, unie au Fer, constitue l'hématine, substance-mère de l'hémoglobine. Elle se trouve en quantité essentiellement variable dans la coquille de la plupart des œufs d'oiseaux, mais elle est particulièrement abondante dans la cuticule superficielle, mi-calcaire, mi-albuminoïdique, de certains œufs de poule fortement colorés en brun. Ses propriétés physiques et chimiques longuement étudiées dans la première partie de ce travail sont, à quelques détails près, celles de toutes les porphyrines. Par contre, son action photosensibilisatrice était jusqu'alors totalement inconnue. Fischer et Kögl ont bien reconnu l'inactivité de son éther méthylique, mais diverses raisons m'ont porté à croire que l'étude des propriétés photodynamiques de l'ooporphyrine elle-même présenterait un grand intérêt :

1° Elle est tout d'abord la porphyrine qui entre dans la constitution de l'hémoglobine. Sa fluorescence y est à vrai dire masquée par l'introduction d'un atome de fer divalent (« hoem » d'Anson et Mirsky), mais le complexe ainsi formé joue cependant, comme fixateur labile d'oxygène, un rôle physiologique de premier plan.

2° Elle est de plus une porphyrine naturelle très répandue dans le règne animal et le règne végétal. Sa présence dans la coquille de l'œuf, les téguments de certains organismes, les levures et les bactéries en font un pigment très important et quoique son rôle dans la calcification soit encore inconnu, il n'est pas douteux qu'il soit en rapport avec ses propriétés physiologiques.

J'ai donc expérimenté cette ooporphyrine, d'une part sur des sujets déjà employés par d'autres auteurs pour l'étude de l'hémato-

porphyrine, d'autre part sur des organismes choisis intentionnellement parmi des groupes zoologiques très différents par leur constitution et leur genre de vie.

Le pigment a été extrait, suivant un procédé déjà décrit en détail (dissolution de la coquille dans de l'alcool additionné d'HCl, puis extraction par l'éther) des coquilles d'œuf de poule brun et d'œuf de goéland. Dans ce dernier cas, il a été soigneusement débarrassé du pigment biliaire (oocyan) qui l'accompagne dans le calcaire et purifié convenablement jusqu'à ce qu'il cristallise par évaporation lente de sa solution éthérée.

Un gros inconvénient pour l'expérimentation physiologique résidait dans l'insolubilité complète de l'ooporphyrine dans l'eau pure ou le sérum artificiel. Aussi était-il nécessaire d'employer des moyens détournés pour l'obtenir en solution isotonique ou inoffensive : ni les liqueurs acides, ni les solvants organiques : alcool ou éther ne pouvaient convenir. Le liquide de Ringer faiblement alcalin et l'huile d'olive neutralisée ont donné, suivant les cas, de bons résultats. La concentration en pigment de ces solutions a été en général de 1 p. 5.000, correspondant sensiblement à l'optimum de fluorescence, avec une toxicité à peu près nulle aux doses employées.

Toutes les fois qu'il a été possible, l'influence photocatalytique de l'ooporphyrine a été étudiée avec des sources de lumière différentes : lumière solaire directe, lumière solaire diffuse, lumière artificielle d'une lampe électrique, radiations de l'arc au mercure filtrées ou non à travers un écran de Wood. De plus, dans le cas de la lumière solaire, il a été essayé l'action des diverses radiations du spectre, séparées au moyen d'écrans colorés laissant passer une lumière sensiblement monochromatique. Ces écrans étaient constitués par des plaques photographiques, débarrassées du bromure d'argent au moyen de l'hyposulfite de soude et dont la gélatine avait été teinte par immersion dans une solution des colorants suivants :

Violet	= violet de méthyle.
Bleu	= bleu de méthylène.
Vert	= vert Lumière.
Jaune	= acide picrique.
Orangé	= aurantia.
Rouge	= écarlate basique.

Les écrans ainsi préparés se sont montrés préférables aux verres colorés du commerce, trop opaques et peu sélectifs. De plus, les colorants employés n'étant pas par eux-mêmes des sensibilisateurs bien actifs, il n'y avait pas à craindre l'absorption de radiations pouvant jouer un rôle important dans la photosensibilisation du sujet d'expérience.

I - Pouvoir hémolitique de l'Ooporphyrine

a) *Hémolyse « in vitro »*

L'ooporphyrine a été dissoute dans du liquide de Ringer légèrement alcalin, suivant le procédé indiqué par Fabre et Simonnet. On mélange successivement au mortier :

{	Ooporphyrine cristallisée	0 gr. 01
	Bicarbonate de sodium à 5 %	0 cc. 1
	Solution saline	0 cc. 5
	Eau distillée q. s. p...	5 cc.

La solution saline indiquée a pour formule :
NaCl — 9 ; Kcl — 4,30 ; $MgCl^2$ — 0,05 ; $CaCl^2$ — 0,21 ; Glucose — 5
Eau distillée q. s. p... 100 cc.

Le taux de la solution de porphyrine est tel qu'après addition de liquide de Ringer et de la suspension d'hématies, la concentration en pigment devient sensiblement égale à 1 p. 5.000. Les hématies de cheval ont été lavées à trois reprises avec du liquide de Ringer (*) et mises en suspension dans ce même liquide.

Expérience I. — Influence de diverses sources lumineuses.

Dans 6 tubes à hémolyse, on répartit :

Solution d'ooporphyrine	V gouttes
Liquide de Ringer	2 cc.
Suspension d'hématies à 10 %	III gouttes

(*) Formule du liquide de Ringer — NaCl—9 ; Kcl—4,30 ; $Mgcl^2$ —0,05 ; $Cacl^2$ —0,21 ; Co^3NaH —0,50 ; Glucose—5 ; Eau q.s.p... 1.000 cc.

Les tubes sont ensuite placés dans les conditions suivantes :

	Temps d'Hémolyse
1. Plein soleil	4 minutes
2. Lumière diffuse	28 minutes
3. Rayonnement de l'arc au mercure	14 minutes
4. Radiations filtrées de l'arc au mercure $\lambda < 430 \text{ m}\mu$.	21 minutes
5. Radiations filtrées de l'arc au mercure $\lambda < 380 \text{ m}\mu$	35 minutes
6. Obscurité de la chambre noire	nulle après 8 h.

Expérience II. — **Influence des diverses radiations solaires.**

Dans 6 tubes à hémolyse sont répartis :

Solution d'ocporphyrine	V gouttes
Liquide de Ringer	2 cc.
Suspension d'hématies à 10 %	III gouttes

Les tubes sont disposés sous chacun des écrans suivants et placés à la lumière solaire. Les temps suivants sont notés :

	Plein soleil	Soleil masqué par des nuages
1. Violet	4 minutes 30"	10 minutes
2. Bleu	7 minutes 30"	13 minutes 30"
3. Vert	6 minutes	13 minutes
4. Jaune	5 minutes 30"	11 minutes
5. Orangé	7 minutes	12 minutes 30"
6. Rouge	nulle après 20 min.	nulle après 20 min.

Expérience III. — **Comparaison avec l'action de l'éosine.**

Dans 6 tubes à hémolyse sont répartis :

Solution d'éosine à 1 p. 1.000	
dans du liquide de Ringer	V gouttes
Liquide de Ringer	2 cc.
Suspension d'hématies à 10 %	III gouttes

Les tubes disposés sous chacun des écrans sont placés en plein soleil.

	Temps d'hémolyse
1. Violet	nulle après 5 h.
2. Bleu	1 heure 15'
3. Vert	45 minutes
4. Jaune	55 minutes
5. Orangé	1 heure 40'
6. Rouge	3 heures

Conclusions. — 1° Les radiations les plus actives, pour l'hémolyse par l'ooporphyrine, sont le violet et le jaune ; l'ultra-violet est peu actif, le rouge complètement inactif.

2° Avec l'éosine, les radiations les plus actives sont les jaunes et les vertes. Le rouge l'est faiblement et le violet est inopérant.

3° Employée à des doses égales, l'ooporphyrine manifeste un pouvoir hémolytique beaucoup plus puissant que l'éosine, dix fois plus élevé environ pour les radiations les plus actives.

b) *Hémolyse « in vivo »*

Les expériences ont été faites avec une solution huileuse d'ooporphyrine préparée de la manière suivante : 20 mgr. de pigment cristallisé sont dissous dans 20 cc. d'éther pur anhydre, la solution obtenue est additionnée d'un volume égal d'huile d'olive pure et neutralisée. Le mélange est ensuite évaporé dans le vide à une douce température jusqu'à ce que l'éther ait entièrement disparu : on obtint ainsi un liquide orangé, possédant en lumière de Wood une fluorescence rouge intense.

Deux cobayes à pelage entièrement blanc sont choisis comme sujets d'expérience. Le premier reçoit chaque jour, par voie sous-cutanée, des doses croissantes de la solution huileuse d'ooporphyrine.

Le 1 ^{er} jour	1/4 de cc.	soit 1/4 de mgr.	de Porphyrine
Le 2 ^e jour	1/2	—	1/2 —
Le 3 ^e jour	1	—	1 —
Le 4 ^e jour	1	—	1 —
Le 5 ^e jour	2	—	2 —
Le 6 ^e jour	2	—	2 —
Le 7 ^e jour	2	—	2 —
Le 8 ^e jour	2	—	2 —

Le second cobaye reçoit, comme témoin, des doses équivalentes d'huile d'olive pure. Les cages renfermant les deux animaux sont exposées à la lumière solaire directe pendant la plus grande partie de la journée.

Le sixième jour commencent à apparaître chez l'animal traité à l'ooporphyrine les symptômes de la photosensibilisation : il se déplace par saccades, présente une allure inquiète ; son poil devient rugueux et tombe facilement. Les oreilles et les pattes très rouges montrent une desquamation accentuée de la peau tandis qu'il se produit des œdèmes aux points d'injection de la porphyrine.

Aucun accident n'a été observé chez le témoin, nourri de la même manière et soumis aux injections d'huile d'olive pure.

Des numérations globulaires, effectuées avec l'appareil de Hayem ont montré à partir du quatrième jour une élévation rapide du nombre des hématies chez le cobaye atteint de porphyrisme.

Le 1^{er} jour = 4.680.000 par mm³ de sang

Le 2^e jour = 4.720.000 — — —

Le 3^e jour = 4.810.000 — — —

Le 4^e jour = 5.390.000 — — —

Le 5^e jour = 5.720.000 — — —

Le 6^e jour = 6.540.000 — — —

Le 7^e jour = 6.980.000 — — —

Le 8^e jour = 7.120.000 — — —

Les injections ayant été arrêtées le huitième jour, les symptômes de photosensibilisation se sont atténués aussitôt ; l'hyperglobulie a par contre persisté quelques jours. Chez le cobaye témoin, il ne s'est produit, sous l'influence sans doute de la vasoconstriction due à la chaleur solaire, qu'une légère élévation du nombre des globules rouges, dépassant de 800.000 seulement par mm³ le taux normal, déterminé au début de l'expérience.

Conclusion. — Le pouvoir photosensibilisateur de l'ooporphyrine, hémolytique « in vitro », se traduit au contraire « in vivo » par une augmentation considérable du nombre des hématies. Il se produit alors une réaction de l'organisme analogue à celle qui engendre l'hyperglobulie dans certaines affections hépatiques et dans la vie normale aux hautes altitudes.

II - Action de l'Ooporphyrine sur les cellules sexuelles de l'Oursin

Les cellules sexuelles de l'oursin (*Paracentrotus lividus*) constituent un réactif physiologique sensible et d'emploi très commode. Elles ont été utilisées par Loch pour l'étude de l'action photosensibilisatrice de l'éosine. Je me suis adressé à elles pour expérimenter l'influence analogue de l'ooporphyrine sur la fécondation et la segmentation de l'œuf.

1° Action sur les cellules isolées et sur la fécondation.

On prépare une suspension de cellules mâles et femelles en délayant dans un peu d'eau de mer un fragment des glandes génitales correspondantes (jaunes chez le mâle, orangées chez la femelle). L'ooporphyrine est solubilisée de la manière suivante. On mêle au mortier :

Ooporphyrine cristallisée	0 gr. 01
Co ³ NaH	0 gr. 05
Eau de mer	10 cc.

(L'addition de bicarbonate de sodium n'apporte aucune modification appréciable dans la tonicité de l'eau de mer qui demeure inoffensive pour les cellules non sensibilisées).

La solution obtenue est employée à la dose de 1 partie pour 9 d'eau de mer, ce qui porte la concentration en porphyrine à 1 p. 10.000. On ajoute à ce mélange placé en pleine lumière 1 goutte de la suspension cellulaire, que l'on observe aussitôt au microscope :

a) Les spermatozoïdes, après 5 minutes d'exposition au soleil, perdent leur mobilité et deviennent inaptes à la fécondation ;

b) Les ovules placées dans les mêmes conditions se montrent beaucoup plus résistants à l'action de l'ooporphyrine : il faut une heure d'irradiation pour qu'ils ne puissent plus être fécondés par des spermatozoïdes actifs. L'influence photosensibilisatrice a cependant provoqué chez quelques-uns d'entre eux un début de segmentation parthénogénétique, limité à trois ou quatre cellules.

2° Influence sur la segmentation de l'œuf.

La fécondation artificielle des œufs d'échinodermes conduit au bout de dix heures à des embryons composés d'une cinquantaine de cellules. Avec des soins particuliers, il est possible de les conserver vivants une semaine et même plus.

La même opération a été effectuée à la lumière en présence d'ooporphyrine, dans de l'eau de mer renfermant ce pigment à une concentration de 1 p. 5.000. Si on ajoute au liquide une goutte de suspension des deux cellules sexuelles, la fécondation se produit aussitôt. L'œuf s'entoure bien d'une membrane protectrice, mais la segmentation est rapidement entravée. Au bout de dix heures, l'embryon se compose seulement de 4 à 8 cellules qui sont rapidement détruites par une exposition un peu plus longue à la lumière.

Si les expériences précédemment décrites sont effectuées dans une pièce faiblement éclairée par une lampe à incandescence, la fécondation se produit normalement et donne un embryon viable.

Conclusion. — L'ooporphyrine exerce, en présence de la lumière, une action nocive sur les cellules sexuelles de l'oursin, mais l'ovule résiste beaucoup plus longtemps que le spermatozoïde, tué presque aussitôt.

Elle n'empêche pas la fécondation, mais arrête très rapidement la segmentation de l'œuf et le développement de l'embryon.

III - Action photosensibilisatrice de l'Ooporphyrine sur les poissons rouges

Il n'était pas possible, à cause de la grande fragilité du poisson rouge (*Carassius auratus*) d'expérimenter sur lui de l'ooporphyrine dissoute dans une liqueur saline quelconque. Il fallait donc lui administrer par voie buccale et le meilleur moyen a consisté à imprégner de porphyrine les daphnies (*Daphnia pulex*) qu'on lui donne comme nourriture habituelle. Dans ce but, on délaye les crustacés desséchés dans une solution éthérée très concentrée d'ooporphyrine ; on les étale ensuite sur un buvard et on les laisse plusieurs jours dans l'obscurité jusqu'à évaporation complète du solvant. Elles renferment ainsi une quantité considérable de porphyrine qui leur donne, en lumière de Wood, une fluorescence rouge très forte.

Les poissons rouges sont divisés en trois lots :

1° Le premier est placé dans un aquarium exposé en pleine lumière et nourri avec des daphnies imprégnées d'ooporphyrine ;

2° Le second, nourri de la même manière, est logé dans un aquarium maintenu constamment dans la chambre noire ;

3° Le troisième lot enfin, jouant le rôle de témoin, est laissé à la lumière et ne reçoit que des daphnies n'ayant subi aucune préparation sensibilisatrice.

Les résultats ne tardent guère. Dès le second jour de ce régime, les poissons du premier groupe montrent les symptômes de la photosensibilisation. Ils se meuvent difficilement et restent immobiles dans le fond de l'aquarium, comme s'ils ne pouvaient monter à l'intérieur du liquide. Le surlendemain, la plupart sont morts quoiqu'ils ne manifestent aucune lésion organique importante ; leurs écailles ont seulement perdu leur éclat et leur transparence.

Aucun accident analogue ne s'est produit chez les poissons des deux autres lots, qui, manquant soit de lumière, soit de porphyrine, ont continué à vivre normalement.

L'ooporphyrine, absorbée par voie buccale, déclanche donc chez les poissons une intoxication lumineuse, caractérisée essentiellement par une paralysie motrice du sujet et qui devient très rapidement mortelle.

IV. - Détermination de la dose toxique d'Ooporphyrine pour le rat blanc

Expérience-type. — Deux rats blancs pesant respectivement 105 et 115 grammes, reçoivent chaque jour, en injection sous-cutanée 1 cc. d'une solution huileuse à 1 p. 1.000 d'ooporphyrine (préparée comme il a été indiqué plus haut). Leurs cages sont placées pendant toute la journée, dans un endroit ensoleillé. Dès le deuxième jour, les symptômes classiques de la photosensibilisation apparaissent : surexcitation, rougeur des oreilles et des pattes, œdème au point d'inoculation, etc. Si, à ce moment-là, on double, chez l'un des animaux, la dose d'ooporphyrine, les phénomènes s'aggravent rapidement et le rat meurt dans des convulsions quelques heures après, alors que le témoin, ramené à l'obscurité, guérit en l'espace d'une nuit.

De plusieurs expériences analogues, il résulte que la dose mortelle d'ooporphyrine s'élève, pour le rat blanc, à 20 mgr. environ par kilo d'animal. Aucun symptôme pathologique ne s'était, bien entendu, produit chez des rats placés en plein soleil, mais ne recevant pas d'injection de porphyrine.

V. - Action photosensibilisatrice du complexe stanneux de l'Ooporphyrine

Des expériences de photosensibilisation, faites avec le complexe stanneux d'une porphyrine, présentaient un grand intérêt : on sait en effet que l'étain, tout en se fixant sur la molécule de porphyrine, respecte son pouvoir fluorescent. La lumière secondaire émise alors est seulement déplacée du côté des courtes longueurs d'onde. Devait-il en résulter des modifications dans l'activité physiologique du complexe ainsi formé ?

Expérience. — Deux rats blancs reçoivent chacun, par voie sous-cutanée, 2 mgr. de complexe stanneux de l'ooporphyrine en solution huileuse. Exposés à la lumière solaire, ils ne tardent pas à présenter tout le tableau de l'intoxication lumineuse, très voisin de celui que provoque l'ooporphyrine pure. Le sujet paraît toutefois plus déprimé ; il reste en état de torpeur dans un coin de sa cage tandis que ses yeux deviennent boursoufflés et vitreux, jusqu'à occasionner une cécité complète. L'administration d'une nouvelle dose de complexe stanneux est rapidement mortelle, alors que, si l'animal est soustrait à l'action de la lumière, il guérit assez vite : ses yeux restent cependant plusieurs jours avant de revenir à leur état normal.

Le complexe stanneux de l'ooporphyrine manifeste donc des propriétés photosensibilisatrices tout aussi accentuées que celles de la porphyrine elle-même. Il provoque de plus la formation de troubles oculaires graves, qui persistent quelque temps après le retour du sujet à l'obscurité. Il semble donc bien que l'introduction d'un atome métallique dans la molécule de porphyrine ne peut annihiler le pouvoir photocatalytique de cette dernière que s'il éteint en même temps sa fluorescence : tel est le cas du fer qui, combiné à la protoporphyrine, en fait une hématine dépourvue à la fois de fluorescence et d'activité pathogène.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les conclusions présentées à la fin de chaque chapitre de cette thèse peuvent se résumer ainsi :

1° La coquille des œufs d'oiseaux présente des colorations variées, dues à deux types de pigments :

a) Des porphyrines en quantité très variable d'un œuf à l'autre, dans la même espèce animale.

b) Des pigments biliaires, présents seulement dans certains œufs et probablement identiques à l'oocyan de Lemberg.

2° Les porphyrines, caractérisées de façon indubitable par leur spectre de fluorescence, sont au nombre de deux :

a) L'ooporphyryne, identique à la protoporphyryne du sang et particulièrement abondante dans la partie externe de la coquille de certains œufs très colorés en brun, mais plus rare dans la masse même du calcaire.

b) Une autre porphyryne présentant les caractéristiques spectrales de l'hématoporphyryne et qui, existant en quantité très faible dans la coquille de tous les œufs, est seule représentée dans ceux dont la coquille est parfaitement blanche.

3° Ces porphyrines proviennent d'une destruction de l'hémoglobine de l'animal : elles se fixent sur le calcaire pour lequel elles possèdent une affinité physique très grande. A côté d'elles, se trouve dans la coquille une quantité de fer équivalente à celle qui rentre dans l'hématine du sang. Mais le mécanisme de cette destruction d'hémoglobine est très obscur ; certaines raisons permettent de l'attribuer à une sensibilisation lumineuse, à un état de porphyrisme fréquent surtout chez les oiseaux à plumage clair.

4° L'ooporphyryne fournit des complexes métalliques, dont certains sont doués d'une fluorescence caractéristique, différente par son spectre de celle que donnent les complexes correspondants de l'hématoporphyryne. Mais, tous ces dérivés métalliques ne peuvent se former qu'avec des métaux divalents ou fonctionnant comme tels. Les uns éteignent la fluorescence (Cu, Ag, Fe), d'autres la déplacent vers le jaune et constituent de précieux réactifs pour l'identification des porphyrines.

5° L'oocyan, pigment vert d'origine biliaire, particulièrement abondant dans la coquille de l'œuf de mouette, donne avec le zinc un complexe fluorescent que son spectre présente comme différent de celui de la biliverdine, ce qui contredit une identité chimique parfaite entre ces deux pigments, cependant très voisins.

6° L'ooporphyrine est, de même que l'hématoporphyrine, rapidement détruite par l'irradiation ultra-violette. Elle donne alors naissance, tout comme la chlorophylle et les pigments biliaires à des urobilines qui, caractérisées spectralement et chimiquement, se trouvent être le terme d'aboutissement commun de ces divers pigments.

7° Le jaune de l'œuf des oiseaux présente, en lumière de Wood, une fluorescence jaune-vert intense, due au lipochrome qui le colore. Ce pigment, mélange de deux caroténoïdes très voisins : xanthophylle et zéaxanthine, est presque identique au pigment des graines de maïs, qui possède une fluorescence analogue. Il existe aussi dans le vitellus de l'œuf, des traces d'une porphyrine qui peut être identifiée, grâce à une technique spectroscopique particulière, à l'ooporphyrine.

8° L'albumine et la membrane coquillière de l'œuf présentent une fluorescence bleutée, toujours intense dans la membrane, mais croissant pour l'albumine, avec l'âge de l'œuf. Cette fluorescence constitue une propriété des albuminoïdes, auxquels se surajoute, dans le blanc d'œuf, un pigment particulier : l'ovoflavine, peut-être identique à la vitamine B₂.

9° L'œuf des oiseaux apparaît donc comme un milieu essentiellement fluorescent dont les diverses parties peuvent transformer l'ultra-violet solaire ou artificiel en radiations rouges, jaunes, vertes et bleues. Ce fait a vraisemblablement sa raison d'être dans les conditions biologiques tout à fait spéciales de l'œuf.

10° L'étude des spectres des fluorescence constitue enfin pour un grand nombre de pigments, une excellente méthode d'analyse, beaucoup plus sensible et tout aussi exacte que l'analyse chimique, qui mérite de prendre une place de premier ordre dans les techniques du biologiste moderne.

11° La photosensibilisation biologique est un phénomène très complexe, dans lequel interviennent plusieurs facteurs :

Un photocatalyseur ordinairement fluorescent ;

Un sujet réceptif et

Un excitant lumineux de longueur d'onde appropriée, sélective en quelque sorte et variant avec le photocatalyseur employé.

12° Comme toutes les porphyrines, l'ooporphyrine se montre physiologiquement très active. Expérimentée sur : les hématies, les cellules sexuelles de l'oursin, les poissons et les petits mammifères, elle manifeste un grand pouvoir photo-sensibilisateur, bien supérieur à celui de l'éosine, et qu'elle conserve dans son complexe stanneux.

13° Son activité ne s'exerce que sous l'influence de radiations lumineuses qui appartiennent surtout à la région jaune-verte du spectre. Les autres radiations, y compris l'ultra-violet, sont peu efficaces, ce qui empêche d'assimiler entièrement la sensibilisation biologique à un phénomène de fluorescence. Le pouvoir photocatalytique de l'ooporphyrine est enfin annihilé par l'adjonction, dans sa molécule, de certains atomes métalliques. Ce fait explique l'innocuité dans l'organisme de l'hémoglobine, dont l'hémochromogène est formé de cette même porphyrine, mais unie à un atome de fer, qui en éteint la fluorescence.

Tels sont les résultats auxquels m'ont amené les recherches exposées au cours de ce travail qui, si l'on envisage l'immense domaine physico-chimique et biologique des porphyrines, ne saurait être complet. Plusieurs problèmes, au point de vue de la photosensibilisation en particulier, restent encore à résoudre et des recherches ultérieures s'efforceront d'aller plus avant dans le vaste champ d'expériences qui leur est ouvert. Claude Bernard n'a-t-il pas dit :

« La prétention d'être complet dans la recherche scientifique n'est qu'une pure illusion. »

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDANT A. et ROUSSEAU F. — Action photolytique sur le saccharose par les radiations totales ou filtrées de l'arc au mercure. — *C. R. Ac. Sc. T.* 186 (1928), p. 365.
2. ANSON and MIRSKY. — « Hoem » in nature. — *Journ. of Physiol.* T. 60 (1925).
3. ARZT und HAUSSMANN W. — Strahlentherapie. T. 11 (1920), p. 444.
4. BARCROFT J. and KEILIN D. — Uteroverdin. *Nature.* T. 128 (1931), p. 967.
5. BAYLE E. et FABRE R. — Recherches sur la fluorescence de quelques composés organiques. — *C. R. Ac. Sc. T.* 178 (1924), p. 632.
6. BAYLE E., FABRE R. et GEORGE H. — Contribution à l'étude de la fluorescence et de ses applications. — *Bull. Soc. Ch. Fr.* T. 37 (1925), p. 89.
7. BAZIN. — Leçons théoriques et cliniques sur les affections génériques de la peau. Paris 1862.
8. BERNHEIM G. et GUYOT M. — Traité d'analyse par les rayons ultra-violetes filtrés. Paris, Maloine, 1932.
9. BIANCANI E. et H. — Les accidents cutanés dus aux rayons ultra-violetes. — *Paris-Médical*, 15 janvier 1927, p. 72.
10. BIERRY H. et HENRI V. — Action des rayons ultra-violetes sur certains hydrates de carbone. — *C. R. Soc. Biol.* T. 68 (1910), p. 821.
11. BIERRY E., HENRI V. et RANC A. — Action des rayons ultra-violetes sur certains hydrates de carbone. — *C. R. Ac. Sc. T.* 151 (1910), p. 317.
12. BIERRY H. et LARGUIER DES BANCELS J. — Action de la lumière émise par la lampe à mercure sur les solutions de chlorophylle. — *C. R. Ac. Sc. T.* 153 (1911), p. 124.
13. BIERRY H. et GOUZON B. — Sur les substances fluorescentes de la coquille d'œuf de poule. — *C. R. Ac. Sc. T.* 194 (1932), p. 653.
14. BIERRY et GOUZON B. — Caractérisation des taches de sang par réaction spectrale. — *Bull. Acad. Médecine.* T. 107 (1932), p. 635.
15. BIERRY H. et GOUZON B. — Mise en évidence de la protoporphyrine du sang par le spectre de fluorescence de son complexe stanneux. — *C. R. Ac. Sc. T.* 198 (1934), p. 615.
16. BOIS E. — Recherches spectrochimiques sur quelques porphyrines animales et sur les combinaisons de l'hématoporphyrine avec le Fer. — *Thèse de Sciences*, Fribourg 1927.

17. BROCK. — Cliniques dermatologiques. — Paris, Masson, 1927.
18. BURGI E. — Das Chlorophyll als Pharmakon. — Leipzig, G. Thieme, 1932.
19. CARNOT et TERRIS. — Un cas d'actinite chronique avec œdème et myasthénie. — *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, 17 juillet 1925.
20. CHEVALLIER A. — Sur la destruction de la vitamine A par les rayons ultra-violets. — *C. R. Soc. Biol.* T. 112 (1933), p. 1681.
21. CLEMENTI. — Action de l'éosine sur le système nerveux central. — *Arch. di Fisiol.* T. 24 (1926), p. 322.
22. CROOKER. — Case of recurrent summer-eruption. — *Brit. Journ. of Derm. and Syphil.* T. 11 (1899), p. 463.
23. CUZIN J. — Etude sur la nature des radiations actives dans les phénomènes de sensibilisation. — *Bull. Soc. Ch. Biol.* T. 12 (1930), pp. 745 et 1401.
24. DERRIEN E. — Note préliminaire sur quelques faits nouveaux pour l'histoire naturelle des porphyrines animales. — *C. R. Soc. Biol.* T. 91 (1924), p. 634.
25. DERRIEN E. et TURCHINI J. — Sur l'accumulation d'une porphyrine dans la glande de Harder des rongeurs du genre Mus et sur son mode d'excrétion. — *C. R. Soc. Biol.* T. 91 (1924), p. 637.
26. DERRIEN E. et TURCHINI J. — Sur les fluorescences rouges de certains tissus ou secretas animaux en lumière ultraviolette. — *C. R. Soc. Biol.* T. 92 (1925), p. 1028.
27. DERRIEN E. — Nouvelles observations de fluorescences rouges chez les animaux. — *C. R. Soc. Biol.* T. 92 (1925), p. 1030.
28. DERRIEN E. — Sur la biologie des porphyrines naturelles. — *Bull. Soc. Ch. Biol.* T. 8 (1926), p. 218.
29. DERRIEN E. — Porphyrines et vers parasites. — *C. R. Ac. Sc.* T. 184 (1927), p. 480.
30. DHÉRE Ch. — Recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons ultra-violets par les albuminoïdes, les protéides et leurs dérivés. — *Thèse de Sc. Nat.*, Paris 1909.
31. DHÉRE Ch. et SOBOLEWSKI S. — Sur quelques propriétés de l'hématoporphyrine. — *C. R. Soc. Biol.* T. 1 (1911), p. 511.
32. DHÉRE Ch. — Détermination photographique des spectres de fluorescence des pigments chlorophylliens. — *C. R. Ac. Sc.* T. 158 (1914), p. 64.
33. DHÉRE Ch., SCHNEIDER A. et VAN DER BOM Th. — Détermination photographique des spectres de fluorescence de l'hématoporphyrine dans divers solvants. — *C. R. Ac. Sc.* T. 179 (1924), p. 351.
34. DHÉRE Ch., SCHNEIDER A. et VAN DER BOM T. — Sur la fluorescence de quelques composés métalliques de l'hématoporphyrine. — *C. R. Ac. Sc.* T. 179 (1924), p. 1356.
35. DHÉRE Ch. et BAUMELER. — Sur la Rufine, pigment tégumentaire de l'Arion rufus. — *C. R. Soc. Biol.* T. 99 (1928), p. 492.

36. DHÉRE Ch. et BAUMELER. — Sur la porphyrine tégumentaire de l'Arion empiricorum. — *C. R. Soc. Biol.* T. 99 (1928), p. 726.
37. DHÉRE Ch. — Sur la fluorescence rouge que présentent, en lumière ultra-violette, certains dérivés de la bilirubine. — *C. R. Soc. Biol.* T. 103 (1930), p. 371.
38. DHÉRE Ch. et FONTAINE M. — Recherches sur la fluorescence des algues et de leurs constituants pigmentaires. — *Annales de l'Institut Océanographique de Monaco*, T. 10 (1931), p. 249.
39. DHÉRE Ch. — Remarques critiques et pratiques sur l'observation des fluorescences rouges en biologie et en biochimie. — *C. R. Soc. Biol.* T. 108 (1931), p. 864.
40. DHÉRE Ch. et ROCHE J. — Recherches sur la fluorescence des pigments du groupe de l'urobiline. — *Bull. Soc. Ch. Biol.* T. 13 (1931), p. 988.
41. DHÉRE Ch. — Sur la porphyrine tégumentaire du Lumbricus terrestris. — *C. R. Ac. Sc.* T. 195 (1932), p. 1436.
- 41^{Bis} DHÉRE Ch. et FONTAINE M. — Recherches spectrochimiques (absorption et fluorescence) sur la Bonelline, pigment tégumentaire de la Bonellia viridis. — *Ann. Institut Océanographique Monaco*, T. 12 (1932), p. 349.
42. DHÉRE Ch. — L'étude spectroscopique et spectrographique des fluorescences biologiques. Sa réalisation pratique. Avantages de la spectrographie. — *Ann. de Physiologie et de Physico-chimie Biologiques*, T. 8 (1932), p. 760.
43. DHÉRE Ch. — Spectre de fluorescence de la coquille de l'œuf de poule. — *C. R. Soc. Biol.* T. 112 (1933), p. 1595.
44. DHÉRE Ch. — Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, von Abderhalden. Nachweis der biologischwichtigen Körper durch Fluoreszenz und Fluoreszenzpektren. — Berlin, Urban und Schwarzenberg, 1933.
45. DHÉRE C., GLUCKSMANN S. et RAPETTI L. — Sur les applications de la spectroscopie et de la spectrographie de fluorescence en microbiologie. — *C. R. Soc. Biol.* T. 113 (1933), p. 1250.
46. DOGNON A. — Action des différentes radiations visibles dans la photosensibilisation biologique. — *C. R. Soc. Biol.* T. 98 (1928), p. 21.
47. DOGNON A. — La photosensibilisation biologique. Influence de la concentration du sensibilisateur et de l'intensité lumineuse. — *C. R. Soc. Biol.* T. 98 (1928), p. 283.
48. DOUGLAS MAC GAY et MAC IVER M. — Cité d'après Jausion, *Paris Médical*, T. 7 (1927), p. 153.
49. EDER J. M. und VALENTA E. — Beiträge zur Photochemie und Spektralanalyse. — *Sitz. der Akad. der Wissensch.* Wien 1913.
50. ESCHER H. — Dissertation, Zürich (1909), p. 28. — (Cité d'après Dhéré Ch. et Fontaine M.), n° 38.

51. EULER H. und HEILSTROM H. — Über die Bildung von Xanthophylle, Carotin und Chlorophyll in belichteten und unbelichteten Gerstenkeimlingen. — *Zeit. für physiol. Chem.* T. 183 (1929), p. 177.
52. EWING P., BLICKENDORFER P., MAC GUIGAN H.-A. — Action des rayons ultra-violets sur l'adrénaline et les corps voisins. — *Journ. Pharm. exp. Thérap.* T. 43 (1931), p. 125.
53. FABRE R. — Contribution à l'étude de l'hématoporphyrine. — *C. R. Ac. Sc.* T. 181 (1925), p. 623.
54. FABRE R. et SIMONNET H. — Contribution à l'étude de l'hématoporphyrine. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* T. 8 (1926), p. 56.
55. FABRY et BUISSON. — Rapport sur l'ultra-violet solaire. — *Rapp. 1^{re} Conf. Intern. Lumière*, Lausanne-Leysin, septembre. 1928.
56. FINK H. — Über die Koproporphyrine der Hefe. — *Biochem. Zeitsch.* T. 211 (1929), p. 65.
57. FINK H. — Über eine Fall von tierischen Oochronose und Beiträge zur experimentellen Porphyrin. — *Zeit. für physiol. Chem.* T. 197 (1931), p. 193.
58. FINK H. und HOERBURGER W. — Über die Oochronose der Schlachttiere. Isolierung von kristallisierten Uroporphyrin aus den Knochen. Identitätsbeweis mit Hilfe der pH Fluoreszenz-Kurven und durch Analyse. — *Zeit. für physiol. Chem.* T. 202 (1931), p. 8.
59. FISCHER H. und KOGL F. — Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine. Über das Ooporphyrin. — *Zeit für physiol. Chem.* T. 191 (1923), p. 241.
60. FISCHER H. und KOGL F. — Über Ooporphyrin aus Kiebitzeierschalen, und seine Beziehungen zum Blutfarbstoff. — *Zeit. für physiol. Chem.* T. 138 (1924), p. 262.
61. FISCHER H. und HILGER J. — Über das Vorkommen von Uroporphyrin als Kupfersalz : Turacin, in der Turakusvögeln und der Nachweis von Koproporphyrin in der Hefe. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 138 (1924), p. 49.
62. FISCHER H. und HILGER J. — Über Blutfarbstoff in der Hefe. Nachweis von Porphyrin in Pflanzen. — *Zeit für Physiol. Chem.* T. 138 (1924), p. 288.
63. FISCHER H. und PUTZER B. — Überführung von Hämin in Protoporphyrin und eine neue Darstellung der Mesoporphyrins. — *Zeit. für physiol. Chem.* T. 154 (1926), p. 39.
64. FISCHER H. und SCHWERTTEL. — Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrin. Über Porphyrin in Pflanzen. — *Zeit. für physiol. Chem.* T. 159 (1926), p. 120.
65. FISCHER H. und KLARER J. — Synthese des Aetioporphyrins, Aetiohämins und Aetiophyllins. — *Liebig's Ann.* T. 448 (1926), p. 178.

66. FISCHER H., TREIBS A. und ZEILE K. — Zur Kenntnis der Hämins, Hämatins und Protoporphyrins. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 193 (1931), p. 138.
67. FISCHER H., TREIBS A. und ZEILE K. — Mechanismus der Eiseneinführung in Porphyrin und Isolierung von kristallisierten Hämin. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 195 (1931), p. 1.
- 67^{Bis} FOURNIER A. — Les phénomènes de photosensibilisation en dermatologie. — *Marseille Médical*, 5 juin 1929.
68. FUNK C. et LECOQ R. — Données actuelles sur les vitamines et leur rôle dans la nutrition. — *Bull. de la Société Scientifique d'Hygiène Alimentaire*. T. 15 (1927), p. 121.
69. FURREG. — *Biol. Zentralblatt*. T. 51 (1931), p. 167.
- 69^{Bis} GAFFRON H. — Über Photooxydationen mittels fluoreszierender Farbstoffe. — *Biochem. Zeitsch.* T. 179 (1926), p. 157.
70. GILBERT et HERSCHER. — Origine rénale de l'urobiline. — *C. R. Soc. Biol.* T. 54 (1902).
71. GOUZON B. — Production d'urobiline par action des rayons ultraviolets sur la chlorophylle et les porphyrines. — *C. R. Ac. Sc.* T. 196 (1933), p. 1542.
72. GUILLAUME A. C. — De l'infra-rouge à l'ultra-violet. Les radiations lumineuses en physiologie et thérapeutique. — Paris, Masson, 1927.
73. GUILLAUME A. C. — Physique et physiologie générale de la photosensibilité et des phénomènes de photosensibilisation. — *Revue phys. et Path. comparées*. T. 319 (1927), p. 187.
74. GUNTHER F. — Die Bedeutung des Hämatoporphyrins in Physiologie und Pathologie. — *Erg. der allgem. Pathol. und path. Anatomie*. T. 20 (1922), p. 635.
75. HAMSİK M. — Über das Porphyrin der Oxyhäminanhydrid. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 158 (1926), p. 15.
76. HAUSSMANN W. — Grundzüge der Lichtbiologie und Lichtpathologie. — *Strahlentherapie*. Urban und Schwarzenberg, Berlin 1923.
77. HUTCHINSON. — A case of summer-eruption recurring with great severity for many years. — *Clinical Soc. Transaction*. T. 22 (1888), p. 80.
78. JAUSION H. et MARCERON. — Le coup de lumière acridinique. Son traitement préventif par la résorcine. — *Bull. Soc. Derm. Syphil.*, 10 juillet 1925, p. 358.
79. JAUSION H. — Les dermatoses par sensibilisation à la lumière. — *Paris Médical*. T. 7 (1927), p. 153.
80. JAUSION H. et PAGES F. — Les maladies de lumière et leur traitement. Paris, Masson, 1933.
81. JAVILLIER M. — De l'hématine à la bilirubine et à l'urobiline. — *Bull. Soc. Ch. Biol.* T. 8 (1926), p. 664.

82. KEILIN D. — On cytochrome, a respiratory pigment. — *Proceed. Roy. Soc. London B.* T. 98 (1925).
83. KIRRMANN A. — La synthèse des porphyrines. — *Bull. Soc. Ch. Fr.* T. 9 (1930), p. 918.
84. KLEIN G. et LINSE H. — Fluoreszenzanalytische Untersuchungen an Pflanzen. — *Oesterr. Bot. Zeitsch.* T. 74 (1930), p. 125.
85. KONIGSDORFER H. — Zur Kenntnis der Porphyrine. — *Stralenth.* T. 28 (1928), p. 132.
86. KRUKENBERG F. W. — Die Farbstoffe der Vögeleierschalen. — *Ver. Physik-med. Gesells. Würzburg.* T. 17 (1883), p. 108.
87. KRUKENBERG F. W. — Grundzüge einer vergl. Physiologie der Farbstoffe und Farben. — Heidelberg, 1884.
88. R. KUHN und SMAKULA. — Spektralphotometrische Analyse der Eidottersfarbstoffes. — *Zeit. für physiol. Chem.* T. 197 (1931), p. 161.
- 88^{Bis} R. KUHN, P. GYORGYI et WAGNER-JAUREGG T. — Über eine neue Klasse von Naturfarbstoffen. — *Berichte d. deut. Chem. Gesell.* T. 66 (1933), p. 137.
89. LAFONT R. — Contribution biochimique et anatomo-pathologique à l'étude de la porphyrinurie expérimentale. — *Thèse Médecine*, Montpellier, 1921.
90. LANGECKER H. — Zur Fluoreszenzbeobachtung bei den Porphyrinen. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 115 (1921), p. 2.
91. LEHMANN H. — Über ein Filter für ultraviolette Strahlen und seine Anwendungen. — *Physik. Zeitsch.* T. 11 (1910), p. 1039.
92. LEMBERG R. — Über Oocyan. — *Liebig's Ann.* T. 488 (1931), p. 74.
93. LOOS S. — Über das Vorkommen von Porphyrin in menschlichen Zähnen und im Zahnstein. — *Zeitsch. für Stomatologie.* T. 11 (1931), p. 1.
94. LUNDBERG H. — Le pouvoir pharmacodynamique du bleu de méthylène. — *C. R. Soc. Biol.* T. 87 (1922), p. 483.
95. MAC MUNN C. A. — Presence of haematoporphyrin in the integuments of certain invertebrates. — *Journ. of Physiol.* T. 7 (188).
96. MARCERON. — Contribution à l'étude de la photosensibilisation par les solutions fluorescentes. — Paris, Thèse, Jouve, 1925.
97. MAYER R. M. — Über den Porphyrin- und Blutfarbstoffwechsel der Hefestelle. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 177 (1928), p. 47.
98. MÉLAS-JOANNIDÈS Z. — Contribution à l'étude des substances phototoxiques. La substance phototoxique de l'*Hypericum crispum*. — *Arch. I. P. hellénique.* T. 2 (1928), p. 161.
99. MEYER-BETZ F. — *Archiv. für Klin. Med.* T. 112 (1913), p. 476.
100. MILROY J. A. — Observations on some metallic compounds of haematoporphyrin. — *The Biological Journal.* T. 12 (1918), n° 4.
101. MITOLO. — Action de l'éosine sur la substance grise de la moelle du crapaud. — *Archiv. di Fisiol.* T. 24 (1926), p. 348.

102. MOOR A. R. — Effet photodynamiques de l'éosine sur les œufs d'oursins. — *Arch. Sci. Biol. (Italia)*. T. 12 (1920), p. 231.
103. MORAT et DOYON. — *Traité de Physiologie*, Paris, Masson, 1899-1918.
104. MOUREU Ch. et DUFRAISSE. — Autooxydation et action antioxygène : sur la théorie de l'action antioxygène. — *C. R. Ac. Sc.* T. 185 (1927), p. 1545.
105. NENCKI et ZALESKI. — Untersuchungen über den Blutfarbstoff. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 30 (1900), p. 389.
106. NOACK K. — *Zeitsch. für Bot.* T. 12 (1920), p. 273.
107. OPPENHEIMER K. — *Handbuch der Biochemie der Menschen und der Tiere. Farbstoffe mit Pyrrolkernen*, von H. Fischer, p. 351. Berlin, Gustav Fischer 1924.
108. PAIC M. et HABER P. — Action des rayons infra-rouges, visibles et ultra-violets sur l'alexine hémolytique (complément) et spectre d'absorption du sérum de cobaye. — *C. R. Ac. Sc.* T. 198 (1934), p. 613.
109. PERRIN F. — La fluorescence des solutions. — *Thèse Sciences*. Paris 1929.
110. PERRIN F. — *Fluorescence. Durée élémentaire d'émission lumineuse*. Paris, Hermann, 1931.
111. PHILIBERT A. et RISLER J. — Action de la lumière du néon sur les bactéries. — *C. R. Ac. Sc.* T. 183 (1926), p. 1137.
112. PHYSALIX M^{me} et PASTEUR F. — Action des rayons ultra-violets sur le venin de vipère aspic. — *C. R. Ac. Sc.* T. 186 (1928), p. 528 et 975.
113. POLICARD. — Sur les phénomènes de fluorescence déterminés dans les tissus par la lumière de Wood. Application à l'histologie de l'ovaire humain. — *C. R. Ac. Sc.* T. 179 (1924), p. 1287.
114. PORTES F. — Caractérisation du sang par le dérivé stanneux de l'hématoporphyrine. — *Bull. Soc. Sc. Méd. Biol. Montpellier*, février 1920.
115. PORTES F. — Sur une nouvelle méthode très sensible de caractérisation du sang par le dérivé stanneux de l'hématoporphyrine et son application en médecine légale. — *Acad. des Sc. et Lettres de Montpellier*, 1920.
116. PORTES F. et LAFONT R. — Essai de porphyrinurie expérimentale. — *C. R. Soc. Biol.* T. 85 (1921), p. 291.
117. PORTES F. et LAFONT R. — La porphyrinurie expérimentale du cobaye. — *Soc. Sc. Méd. Biol. Montpellier*, juillet 1921.
118. PORTES F. — Les procédés de recherche de l'hématoporphyrine dans l'urine. — *Bull. Soc. Sc. Méd. Biol. Montpellier* 1923.
119. PORTES F. et LAFONT R. — Essai sur la porphyrinurie expérimentale. Injections intraveineuses de sulfonal dissous dans l'acétone. — *Bull. Soc. Sc. Méd. Biol. Montpellier* 1923.

120. POZZO DI BORGO. — Recherches de biophysique comparée sur les porphyrines animales et sur la porphyrine sulfonalcque.
121. PRIME F. — *Strahlentherapie*. T. 2 (1913), p. 76.
122. REBELLO S. — L'action biologique des substances fluorescentes. L'action photodynamique de l'éosine sur les plantes. — *C. R. Soc. Biol.* T. 83 (1920), p. 885.
123. RICHERT. — Les pellagres animales. — *Thèse Vétérinaire*, Paris, 1927.
124. RICHTER. — *Anzeiger der Akad. der Wissens. Wien*. T. 6 (1932), p. 54.
125. RISLER J. et FOVEAU DE COURMELLES. — Sur le choc radiant. — *C. R. Ac. Sc.* T. 184 (1927), p. 701.
126. ROYER M. — L'Urobiline. Paris, Masson, 1932.
127. SACCHAROFF et SACHS. — *Münchner med. Wochens.* (1905), n° 7.
128. SCHUMM O. — Spektroskopisch-chemische Reaktionen einiger Porphyrine. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 136 (1924).
- 128^{Bis} SEYEWETZ J. — Les nouvelles méthodes d'analyse. La lumière de Wood. — Paris, Baillière, 1934.
129. SMADJA H. — Caractérisation du sang par le dérivé stanncux de l'hématoporphyrine. — *Thèse Médecine*, Montpellier 1922.
130. SORBY H. C. — On the evolution of hoemoglobin. — *Quart. Journ. of microscopic Sc.* T. 16 (1876), p. 76.
131. TANRET. — De l'ergostérol irradié à la vitamine D cristallisée, d'après les travaux de Bourdillon et de Windaus. — *Bull. Soc. Ch. Biol.* T. 15 (1934), p. 1346.
132. TARDIEU. — Intoxication aiguë par le véronal et les autres dérivés de la malonylurée (barbiturisme). — *Thèse Médecine*, Paris 1924.
133. TAPPEINER VON und JODLBAUER. — Effet sensibilisant des substances fluorescentes. Recueil de recherches sur le photodynamisme. — Leipzig, F. Vogel, 1907.
134. TAPPEINER VON H. — Sensibilisation par les matières fluorescentes. — *Erg. für Physiologie*. T. 8 (1907), p. 698.
135. TERENYI A. — *Zeit. Untersuch. Lebensmittel.* T. 62 (1931), p. 566.
136. TSWETT. — Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. — *Ber. d. deutsch. botan. Gesells.* T. 24 (1906), p. 316.
137. TSWETT. — Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. — *Ber. d. deutsch. botan. Gesells.* T. 24 (1906), p. 389.
138. TURCHINI J. — Sur l'histologie et l'histophysiologie de l'oviducte de la poule. — *C. R. Congrès des Anatomistes*. Strasbourg 1924.
139. VAN DER BOM Th. — Recherches sur la fluorescence de l'hématoporphyrine. — *Thèse de Sciences*. Fribourg 1924.
140. VEGEZZI. — Recherches sur quelques pigments des invertébrés. — *Thèse de Sciences*. Fribourg 1916.

141. VELLUZ L. — Constitution et activité des carbures synthétiques, agents de cancérisation expérimentale. — *Journ. Pharm. et Ch.* T. 19 (1934), p. 77.
 142. VERDA D. J., KNEER L. et BURGE W. E. — Effets de l'irradiation ultra-violette sur l'action hypertensive de l'adrénaline. — *Journ. Pharm. exp. Thér.* T. 42 (1931), p. 383.
 143. VERNE J. — Les pigments dans l'organisme animal. Paris, Doin, 1926.
 144. VERNE J. — Couleurs et pigments des êtres vivants. Paris, A. Colin, 1930.
 145. VOGEL H. — Über die Lichtempfindlichkeit des Bromsilbers für die sogenannten chemisch unwirksamen Farben. — *Ber. d. deuts. chem. Gesells.* T. 6 (1873), p. 1302.
 146. WAEGENINCH V. et HEESTERMANN. — *Chem. Weekblad Maestricht.* T. 24 (1928), p. 622.
 147. WILLSTATTER R. und ESCHER H. — Über das Lutein des Hühnereidotter. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 76 (1911), p. 214.
 148. WILLSTATTER R. und FISCHER M. — Untersuchungen über den Blutfarbstoffe. Über den Abbau des Hämins zu den Porphyrinen. — *Zeit. für Physiol. Chem.* T. 87 (1931), p. 423 et 460.
 149. WILLSTATTER R. und STOLL A. — Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. — Berlin 1918.
-

TABLE DES MATIÈRES

<i>Introduction</i>	Pages 9
---------------------------	------------

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I. — Généralités sur les phénomènes de fluorescence et leur utilisation pratique	15
CHAPITRE II. — Les pigments de l'œuf des oiseaux. Les Porphyrines	27
EXPÉRIENCES PERSONNELLES (<i>Plan</i>)	39
CHAPITRE III. — Les Porphyrines et les pigments biliaires de la coquille	41
CHAPITRE IV. — Les complexes métalliques des Porphyrines et de l'Oocyan	61
CHAPITRE V. — Action des rayons ultra-violets sur la Chlorophylle et les Porphyrines	75
CHAPITRE VI. — Les Fluorescences des parties internes de l'œuf	89

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I. — Etude de la photosensibilisation biologique	101
CHAPITRE II. — Expériences personnelles sur les propriétés sensibilisatrices de l'Ooporphyrine	119
CONCLUSIONS GENERALES	129
<i>Bibliographie</i>	133
<i>Planches</i>	

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté :

Excitabilité des cellules pigmentaires dans la série animale

Vu et approuvé :

Paris, le 16 Juillet 1934.

Le Doyen de la Faculté des Sciences.

CH. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

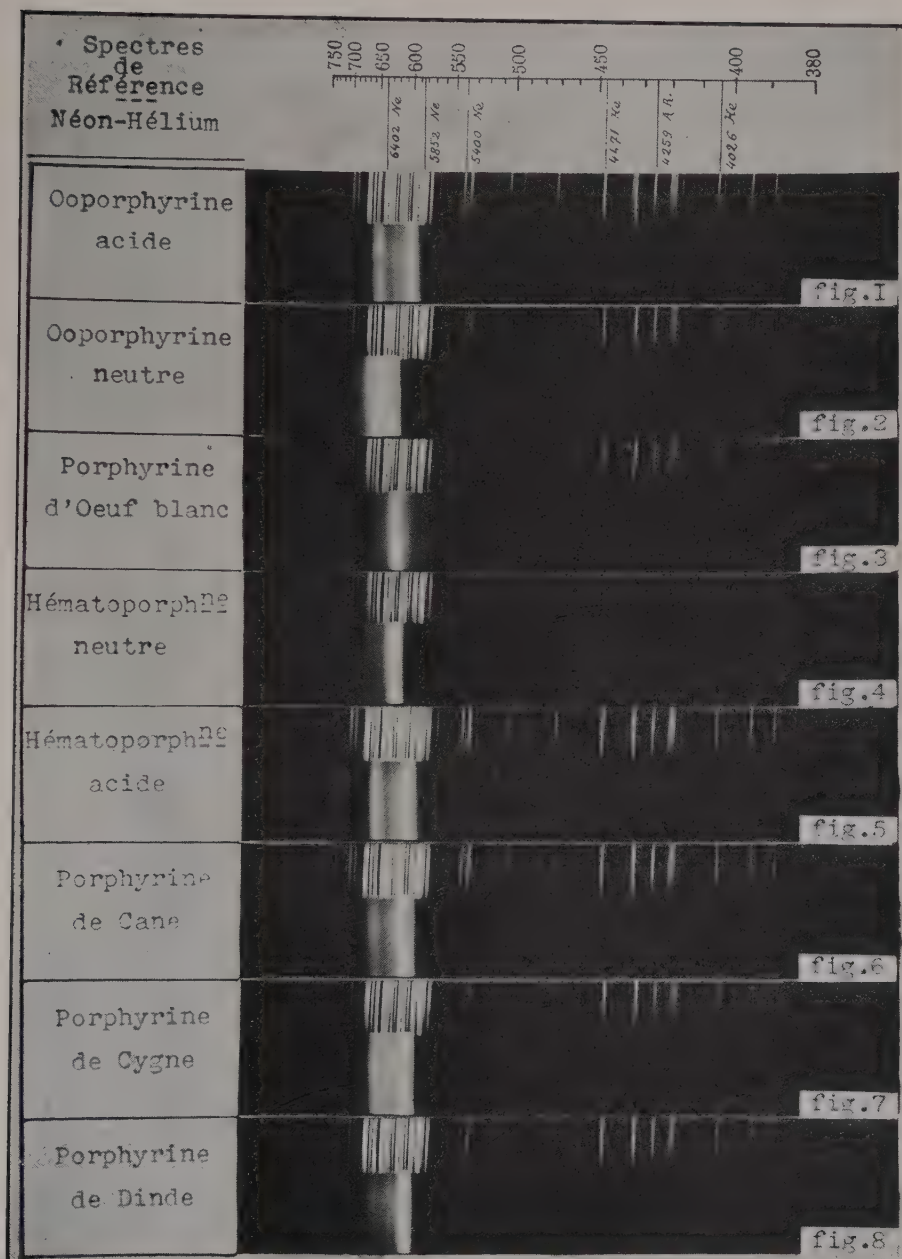
Le Recteur de l'Académie de Paris :

S. CHARLÉTY.

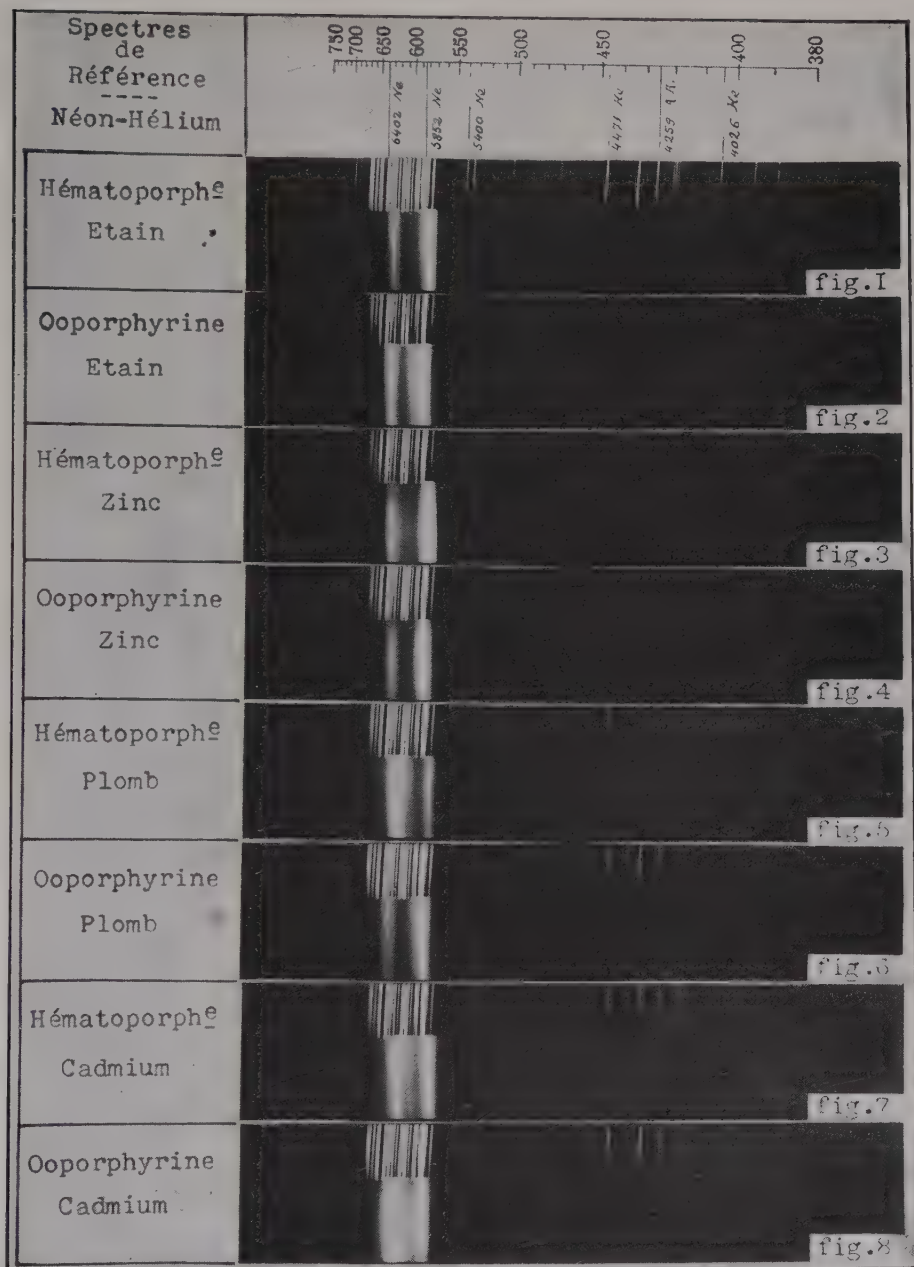
IMPRIMERIE MARSEILLAISE

39, RUE SAINTE, 39

B. GOUZON - Spectres de Fluorescence - Planche I.



B. GOUZON - Spectres de Fluorescence - Planche II.



B. GOUZON - Spectres de Fluorescence - Planche III.

